

보툴리눔 독신-A가 백서의 임의 피관 생존율에 미치는 영향

김영석 · 이재수 · 유원민 · 탁관철

연세대학교 의과대학 성형외과학교실, 인체조직복원연구소

The Effect of Botulinum Toxin-A on the Survival of Random-Pattern Cutaneous Flap in Rat

Young Seok Kim, M.D., Chae Su Lee, M.D.,
Won Min Yoo, M.D., Ph.D., Kwan Chul Tark, M.D., Ph.D., FACS

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Institute for Human Tissue Restoration, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Botulinum toxin type A(BoTA) can block the release of vasoconstriction cotransmitters as well as acetylcholine in nerve terminal. The authors observed that BoTA increases flap survival by preventing sympathetic collapse of peripheral vessels.

Methods: 10 Sprague Dawley rats were divided into control(n=5), and BoTA group(n=5). 3 × 10 cm sized random pattern cutaneous flaps were elevated on the dorsal side in both groups. In BoTA group, BoTA was injected into the flap via intradermal to subdermal route, 7 days before the flap elevation. Flap survival rates (survival area/total area) were measured 7 days after the elevation. Cutaneous blood flow was measured in proximal, middle and distal compartments of the flap using laser Doppler flowmetry initially, preoperatively, at immediate postoperation, and 7 days after flap elevation, respectively. Histological examination was performed 7 days after the flap elevation. The number and shape of the vessels were evaluated under microscope.

Results: Mean flap survival was 53.18 ± 6.58% in control group and 93.79 ± 6.06% in BoTA group, displaying statistically significant difference($p=0.0008$, $p < 0.05$). In the control group, blood flow to the middle and distal compartments of the flap decreased significantly immediately after flap elevation. In the BoTA group,

blood flow to the middle compartment did not decrease($p=0.002$) and slightly decreased in the distal compartment($p=0.001$). Cutaneous blood flow was significantly higher in all compartments of the flap in BoTA group than in control group, 7 days after the flap elevation. In histopathologic examination, greater number of vessels were noted in the BoTA group than in the control group.

Conclusion: Botulinum toxin A can increase the survival of the random pattern cutaneous flap in rats by preventing the sympathetic collapse of peripheral vessels.

Key Words: Botulinum toxin A, Random pattern cutaneous flap, Flap survival

I. 서 론

임의피관은 재건방법으로 널리 사용되고 있다. 피관의 생존을 위해서는 충분한 혈류공급이 가장 중요하며, 피관의 혈관분포 상태가 손상받았을 때나 부적당한 디자인으로 피관거상을 했을 경우에는 피관의 부분 혹은 완전 괴사가 올 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 많은 방법들이 소개되어 왔다. 지연처치는 피관 생존을 높여줄 수 있는 방법으로 사용되어 왔으나 두 단계에 걸쳐 수술을 해야 한다는 단점이 있다. 이에, 임의피관의 허혈을 막거나 줄여주기 위한 교감신경억제제, 혈관확장제, 칼슘 통로 차단제, 혈액유변학적 약물(hemorheological agents), 항응고제, 글루코코르티코이드 그리고 유리기제거제(free radical scavengers) 등의 다양한 약물이 연구되었다. 하지만 대부분의 약제들은 전신투여 및 고용량 투여를 필요로 하며 이로 인한 전신부작용을 감수해야만 한다. 이러한 단점을 극복하기 위해 국소도포제로 노니브라미드(nonivamide)나 니코복실(nicoboxil) 등이 소개 되었으나 그 효과는 크지 않은 것으로 생각된다.¹

보툴리눔 독신(Botulinum toxin)은 다양한 목적으로 사용되고 있다. 눈꺼풀연축, 편측안면연축, 사경의 치료에 이용되고 있고, 두통에도 효과가 입증되었으며, 성형외과 영역에서는 안면회춘(facial rejuvenation)에 많이 사용되고 있다.^{2,5}

Received February 27, 2008

Revised March 25, 2008

Accepted April 18, 2008

Address Correspondence: Won Min Yoo, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Youngdong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, 146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea. Tel: 02) 2019-3420 / Fax: 02) 3463-4914 / E-mail: wnmnyoo@yuhs.ac

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2005년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음. (과제번호: 6-2005-0038)

보툴리누스균(*Clostridium botulinum*)에서 분비되는 보툴리눔 독신은 신경독(neurotoxin)과 다양한 비독성 단백질(non-toxic protein)으로 구성되어 있다. 보툴리눔 신경독은 무거운 사슬(heavy chain; 100 kDa)과 가벼운 사슬(light chain; 50 kDa)으로 구성된 폴리펩티드 사슬(polypeptide chain; 150 kDa)이고, 이것이 두 가지 사슬로 단백질분해가 되면서 활성화된다.⁶ 보툴리눔 신경독은 A, B, C, D, E, F, G의 7가지 혈청형(serotype)이 밝혀져 있고, 이 중 A형이 가장 널리 연구되고, 사용되고 있다.⁷

보툴리눔 독신의 기전은 신경축삭말단에서 아세틸콜린 유리에 관여하는 운반단백(transport protein)인 SNARE 복합체(Soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor Attachment Receptor)에 보툴리눔 독신의 가벼운 사슬이 특이성을 가지고 붙어 분할시킴으로써 결과적으로 아세틸콜린 소포가 신경말단 세포막에 소포융합하는 것을 억제한다.⁸ 표적조직(target tissue)이 근육이 된다면 화학적탈신경(chemical denervation)이 일어나게 되고, 외분비샘(exocrine gland)이라면 샘분비가 억제된다. 이러한 SNARE 단백질복합체 억제는 일시적인 것으로 알려져 있다.⁹

보툴리눔 독신의 작용이 자율신경계에도 영향을 미친다는 연구가 나오면서 이완불능증의 원위부식도괄약근, 오디괄약근, 치열에서 내향문괄약근 등의 과항진된 평활근 치료에 사용되고 있고, 방광수축근, 위마비(gastroparesis) 시의 유문(pylorus) 치료에도 사용되고 있다.³ 교감신경에 영향을 미쳐 다한증, 과다침분비, 눈물 분비과다 치료에도 좋은 효과가 있다는 연구도 있다.¹⁰

한편 쥐의 자궁동맥과 하대정맥을 이용한 실험적 연구에서 보툴리눔 독신-A가 혈관수축 신경세포의 공동전달체(cotransmitter)인 노르에피네프린의 분비를 억제한다는 보고가 있었다.¹¹

따라서 저자들은 보툴리눔 독신-A를 피판거상시 피판에 투여했을 때 말초순환의 경련(spasm)으로 인한 원위부의 울혈 혹은 괴사가 일어나는 것을 억제하여 피판 생존율을 향상시킬 수 있을 것이라는 가설을 설정하고 이에 대한 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

300 - 400 g 사이의 백서(Sprague Dawley)를 이용하였다. 보툴리눔 독신-A의 최적 투여량을 결정하기 위한 예비실험에서, 본 실험에서의 방법과 마찬가지로 2, 4, 8, 10, 15, 20, 30 U를 각각 2마리씩 총 14마리에 투여하고 피판을 거상하여 10 U까지는 피판 생존율이 증가하다가 그 이상에서는 효과의 차이가 없음을 확인하고 10 U를 투여하기로 결정하였다. 본 실험에서는 총 10마리의 백서를 5마리씩 두 개의 군으로 나누어, 대조군은 보툴리눔 독신 투여없이 피판을 거상하였다. 실험군은 피판을 거상하기 7일 전 보툴리눔 독신-A(Botox®, Allergan, Ca, USA) 10 U을, 25 U/cc로 주사용 생리식염수에 희석하여 피판의 근위부, 중간부, 원위부에 골고루 피내 혹은 피하 투여하였다. 피판거상 7일 전 투여한 이유는 보툴리눔 독신-A에 의한 완전 마비 및 임상적 효과가 보통 7일 경과한 시점부터 나타나기 때문이다.³

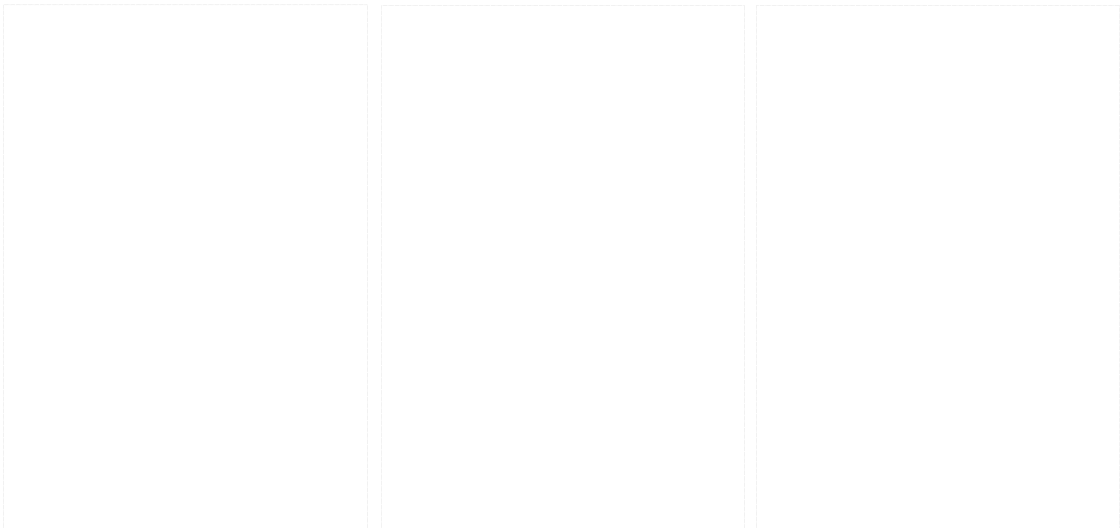


Fig. 1. Design and elevation of dorsal cutaneous random pattern skin flaps. (Left) Intraoperative marking of the flap. (Center) Proximally based rectangular flap(3 × 10 cm) was elevated and silicone sheet was inserted between dorsal muscle and flap. (Right) The flap was sutured in place.

케타민(Ketamine; 75 mg/kg)과 자일라진(xylazine; 3 mg/kg)의 복강 내 주사하여 백서를 마취하고 배부 전체에 제모제를 발라 체모를 제거하였다. 그런 다음, 배부의 중앙에 피하근육층(panniculus carnosus muscle)을 포함하는 3×10 cm 크기의 피판을 견갑골 하연에서 기저부를 두고 종으로 거상하였다. 이 후 바닥에서부터 신생되어 들어오는 혈류를 차단하기 위해서 실리콘 시트(Bioplexus corporation®, Ca, USA)를 피판 바닥에 깔고 피판을 다시 원위치시켜 4-0 나일론 봉합사로 봉합하였다(Fig. 1). 마취가 깬 후 창상 부위를 서로 물어뜯는 것을 막기 위해 한 개의 우리 당 한 마리씩 넣어 사육하였다.

피판거상 후 7일째에 피판 생존율을 구하였다. 이를 위해 술후 7일째 디지털사진을 얻어 사이언이미지(Scion image®, NIH-Scion Corporation, USA) 프로그램에 적용하였다(Fig. 2). 프로그램을 적용하여 이미지상 길이를 실제 길이로 보정하였고 이를 이용하여 전체면적을 측정하였다. 생존 면적은 피사가 일어나서 경계 구분된 부분의 면적을 전체면적에서 뺀 것으로 정하였다. 피판의 생존율은 전체 면적에 대한 생존 면적의 백분율(%)로 하였다.

피판내 혈류의 변화를 알아보기 위해서 뒤에 레이저도플러(Periflux system 5000, Perimed AB, Sweden)을 사용하였다. 4번의 순차적인 측정을 하였는데 보툴리눔 독신-A를 투여하기 전의 초기상태, 투여 7일 후 피판을 거상하기 직전, 피판을 거상한 직후, 피판을 원위치 시킨 후 7일 후에 레이저도플러를 이용하여 원위부, 중앙부, 근위부의 피부 혈류상태를 측정하였다(Fig. 2). 탐촉자(probe)를 피판에 수직으로 대고 각각 1분씩 측정

후 평균값을 구하고 혈류는 PU(perfusion unit)로 기록하였다. 대조군에서도 동일한 시기에 동일한 방법으로 측정하여 결과를 비교하였다.

피판거상 7일 후에 실험군과 대조군의 근위부, 중앙부, 원위부의 중앙에서 각각 표본을 얻어서 10% 포름알데히드에 고정하였다. 고정된 조직은 파라핀 절편(paraffin-embedded block)을 만들어 슬라이드에 장착한 후 Hematoxylin and Eosin stain을 시행하여 조직학적 차이를 관찰하였다. 특히 피하혈관층에서의 손상되지 않은 혈관의 개수와 허탈 정도를 관찰하였다.

실험 결과는 평균±표준 편차로 표시하며, 각 군간의 비교는 Student's paired t-test로 검정하였다. p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

III. 결 과

대조군과 실험군은 각각 평균 53.18±6.58%와 93.79±6.06%의 피판 생존율을 보였으며(Table I, Fig. 3), 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.0008).

Table I. Survival Rate of the Random Pattern Cutaneous Flap in Each Group

Group	Mean survival rate(%) ± SD
BoTA group	93.79 ± 6.06
Control group	53.18 ± 6.58

*BoTA: Botulinum toxin type A, p=0.0008

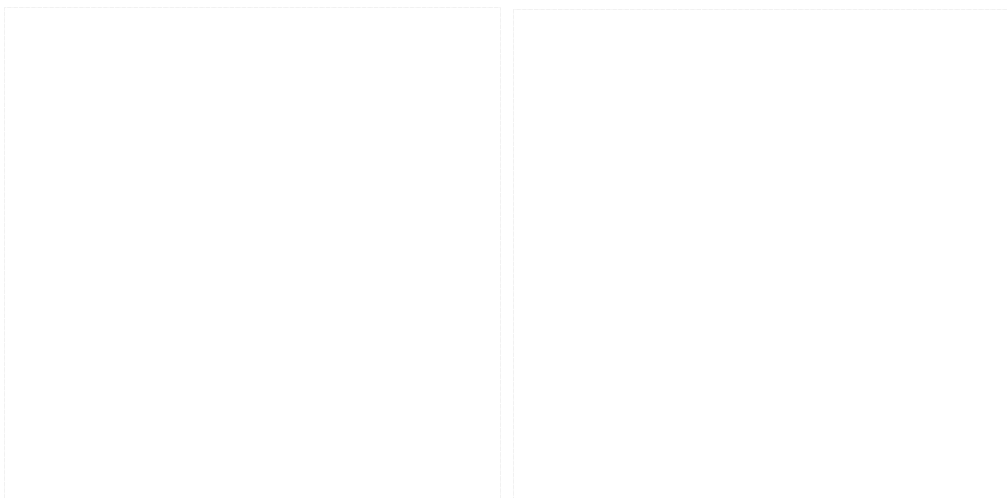


Fig. 2. Evaluation of flap survival and cutaneous blood flow. (Left) Flap survival rate was digitally measured by Scion Image®(NIH-Scion Corporation, USA). (Right) Cutaneous blood flow was measured in 3 compartments of the flap(proximal, middle and distal) by laser doppler system(Periflux® system 5000, Perimed AB, Sweden).

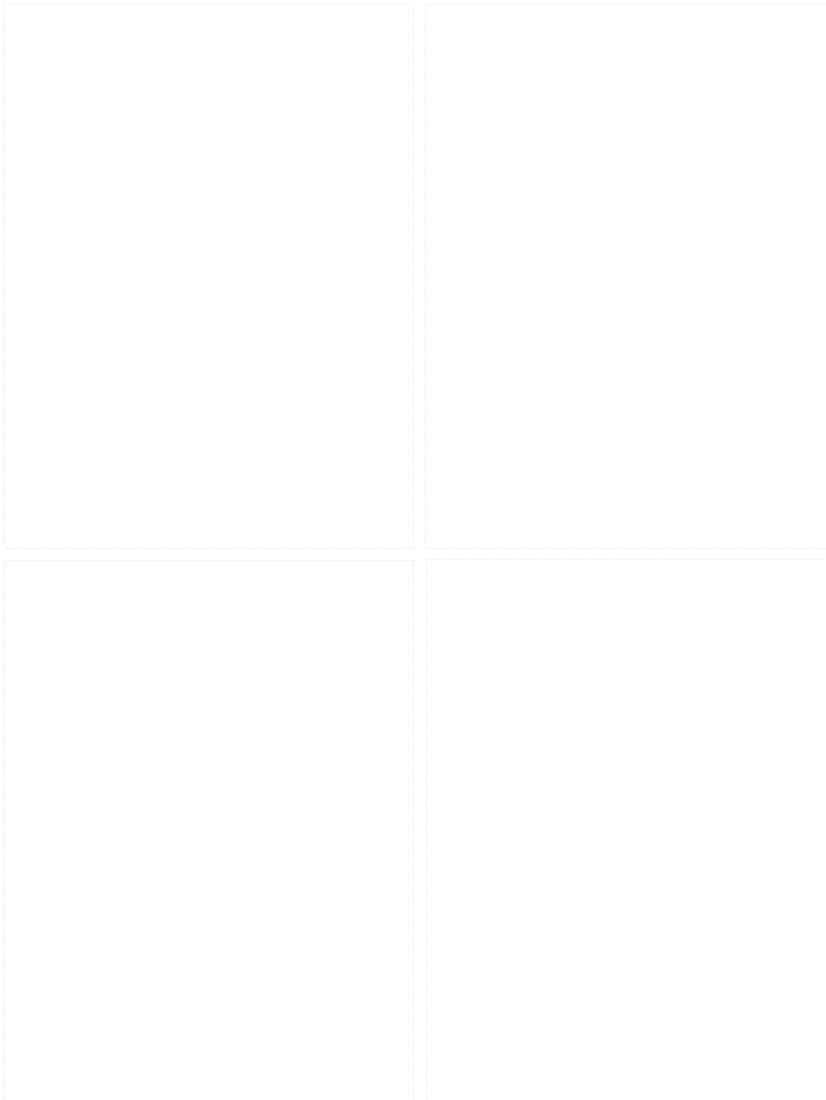


Fig. 3. Flaps in each group, in postoperative seven days. (Above, left and right) Control group. (Below, left and right) Botulinum toxin group. Botulinum toxin group showed nearly complete survival of the flaps.

Table II. Measured Cutaneous Blood Flow by Laser Doppler Flowmetry

	Control			BoTA		
	Proximal(PU)	Middle(PU)	Distal(PU)	Proximal(PU)	Middle(PU)	Distal(PU)
Initial*	30.8 ± 2.8	32.6 ± 5.3	28.2 ± 4.9	31.4 ± 5.0	32.8 ± 3.9	29.4 ± 5.5
Preop [†]	31.4 ± 4.9	32.2 ± 5.1	30.2 ± 2.2	42 ± 5.7	35.8 ± 2.1	37 ± 3.1
Postop+	51 ± 9.6	9.6 ± 3.6	1.7 ± 0.9	56 ± 10.4	32.2 ± 3.5	10.6 ± 2.4
POD#7 [‡]	38.8 ± 5.4	16.4 ± 3.8	0	61.8 ± 11.7	44.6 ± 7.8	29.8 ± 4.3

BoTA: Botulinum toxin type A, PU: perfusion unit, Initial: 7 days before flap elevation and just before injection of BoTA, Preop: just before flap elevation and 7 days after injection of BoTA, Postop: immediately postoperative, POD#7: 7 days after flap elevation, *: $p=0.7881$ (Proximal) $p=0.9612$ (Middle) $p=0.78$ (Distal), [†]: $p=0.0441$ (Proximal) $p=0.276$ (Middle) $p=0.0205$ (Distal), +: $p=0.1837$ (Proximal) $p=0.001$ (Middle) $p=0.002$ (Distal), [‡]: $p=0.0028$ (Proximal) $p=0.0017$ (Middle) $p<0.0001$ (Distal)

초기 상태에 측정된 혈류는 대조군과 실험군 사이에 통계학적으로 차이가 없었다. 보툴리눔 주사 1주일 후, 피관거상 전 측정된 혈류는, 실험군에서 대조군에 비해

근위부와 원위부의 혈류가 통계학적으로 유의미하게 증가되었음을 보였다. 피관거상 직후에는 두 군에서 모두 거상 직전에 비해 근위부에서는 혈류의 증가를

보였고, 중앙부와 원위부에서는 감소를 보였는데, 대조군의 중앙부에서 평균 32.2 PU에서 9.6 PU로 감소한 반면 실험군의 중앙부에서는 평균 35.8 PU에서 32.2 PU로 감소량 상대적으로 현격하지 않았다. 원위부에서도 비슷한 양상을 띠었으며, 두 군을 비교한 결과 중앙부와 원위부에서 통계학적으로 유의하게 실험군에서 혈류가 더 많음을 보였다. 피판 거상 1주일 후 피사부위가 명확해졌을 때 측정된 피판의 혈류 평균은 대조군에서 근위부 38.8 PU, 중앙부 16.4 PU, 원위부 0 PU로 측정되었으며, 실험군에서 근위부 61.8 PU, 중앙부 44.6 PU, 원위부 29.3 PU으로 나타났다(Table II, Fig. 4). 이 때, 두 실험

군 간 모든 부위에서 통계학적으로 유의한 차이(근위부 $p=0.0028$, 중앙부 $p=0.0017$, 원위부 $p<0.0001$)를 보였다 (Table III).

술후 7일째 피판의 근위부, 중앙부, 원위부에서 얻은 조직을 H&E 염색 후 관찰한 결과 실험군에서 대조군에 비해 세동맥, 세정맥, 모세혈관의 개수가 더 많았고, 그 크기 또한 상대적으로 컸다. 피하근육층은 실험군에서 상대적으로 위축되어 있었으며 이로 인해 피하 공간이 대조군에 비해 느슨한 모습을 보였다(Fig. 6). 이러한 차이는 주로 중앙부에서 현격하였다.

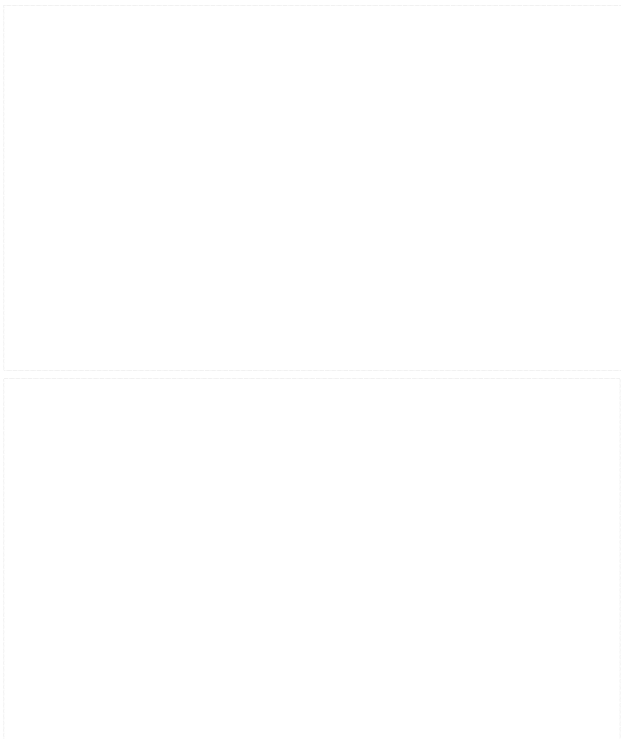


Fig. 4. Serial measurements of the cutaneous blood flow by laser doppler flowmetry in each group. Bars show the mean values of perfusion units in each compartment. (Above) Note that the blood flow in distal compartment was maintained in BoTA group, (Below) but in control group blood flow in middle and distal compartment were significantly decreased.

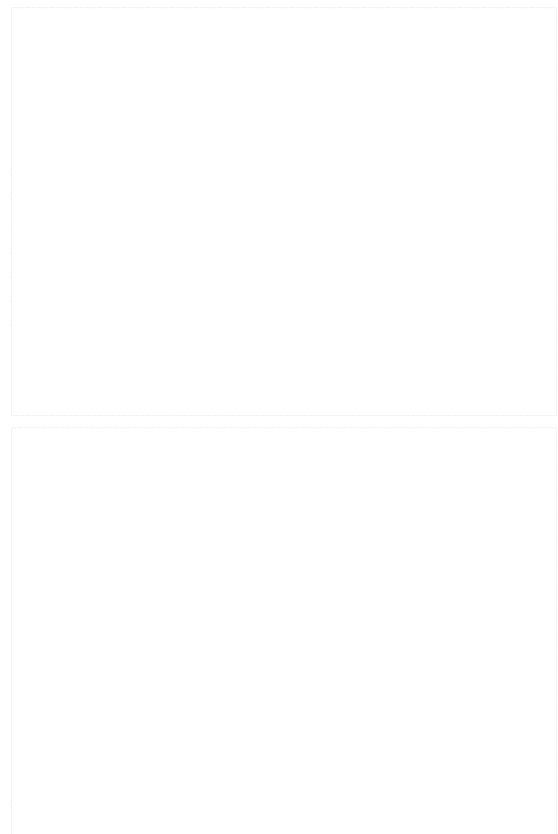


Fig. 5. Histologic view of the cross sections of middle compartment of the flap in BoTA group. (Above) Arterioles and capillaries(arrows). (Below) Non-collapsed patent capillaries were noted(Hematoxylin and eosin stain, $\times 40$).

Table III. Paired T-test between BoTA Group and Control Group in Measurement of Blood Flow by the Laser Doppler Flowmetry

<i>p</i> value	Initial	Preop	Postop	POD#7
Proximal	0.7881	0.0441	0.1837	0.0028
Middle	0.9612	0.276	0.001	0.0017
Distal	0.78	0.0205	0.002	< 0.0001

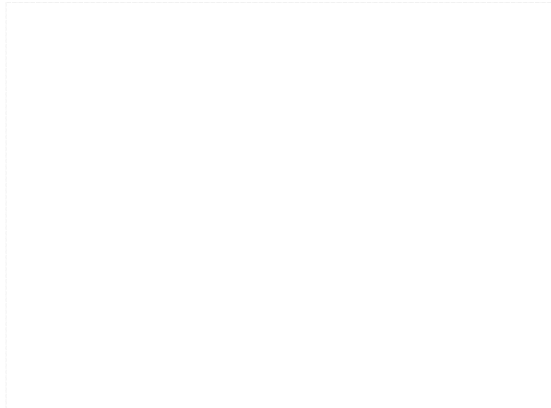


Fig. 6. Histologic view of the cross sections of middle compartment of the flap in control group. Many collapsed capillaries were noted (arrows) (Hematoxylin and eosin stain, × 40).

IV. 고 찰

Morris 등은 보툴리눔 독신-A가 혈관수축에 관여하는 교감신경과 혈관이완에 관여하는 신경에 미치는 영향에 대해 보고하였다. 그들은 쥐의 자궁동맥과 대정맥을 이용한 실험에서 보툴리눔 독신-A가 SNAP-25를 분할하여 불활성화시킴으로써 혈관수축신경에서 분비되는 노르에피네프린과 같은 공동전달체를 억제한다고 보고하였다.¹¹ 하지만 혈관이완신경에서 분비되는 산화질소(NO)에는 영향을 주지 않는다고 보고하였다.¹² 한편 수술적으로 교감신경절제술을 한 이후에 피부의 혈류가 증가됨을 증명한 보고들이 있어 왔고,¹³ 또한 교감신경절제술을 통해서 근육피관의 미세순환이 증가됨을 실험적으로 증명한 보고도 있었다.¹⁴ 저자들은 앞서 기술한 보툴리눔 독신-A의 특성과 수술적 교감신경절제술의 효과를 이용하여 임의 피관거상 시 보툴리눔 독신-A를 전처치할 경우 약리적인 지연처치 효과를 얻어 허혈상태에 있는 피관의 순환을 증가시켜 줄 수 있을 것으로 생각하였다.

본 실험에서 실험군의 피관 생존율이 93.79%로 대조군의 53.18%보다 높게 나타났다. 레이저도플러를 이용한 혈류의 차이를 볼 때, 생존율의 차이는 피하혈류의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 보툴리눔 독신-A투여 전과 투여 후 7일 뒤, 피관거상직후와 술후 7일째에 순차적으로 혈류를 측정된 결과, 투여 7일 후 대조군에 비해 근위부와 원위부에서 통계학적으로 유의하게 혈류의 증가가 나타났으며, 통계학적으로 유의하지는 않으나 중앙부에서도 다소의 혈류의 증가가 있었다. 피관거상 직후에는 약물투여 이전과 비슷한 정도로 혈류가 감소하였으며, 대조군과 비교하여서는 통계학적으로 유

의하게 혈류가 많음을 알 수 있었다. 술후 7일째에는 대조군에서는 피관 피사로 인해 혈류가 없었던 반면, 실험군에서는 원위부까지도 약물 투여 전과 비슷한 정도로 혈류가 증가되어 있었다.

대조군의 경우 피관거상시의 스트레스로 인한 교감신경성 혈관수축으로 인해 피관 원위부의 피사가 오는 반면, 실험군에서는 보툴리눔 독신-A를 전처치함으로써 노르에피네프린과 같은 공동전달체의 분비를 억제하여 혈관경련과 허탈이 방지되는 것으로 생각된다. 조직학적 조건 역시 이를 뒷받침하는데, 실험군에서 대조군에 비해 세동맥, 세정맥 그리고 모세혈관의 개수가 더 많고 크기도 더 컸다. 대조군에서는 일부 큰 혈관을 제외하고는 허탈되어 있는 혈관들이 많았다.

본 연구는 몇 가지 한계를 지니고 있는데, 첫째로 쥐의 피부는 인간과는 달리 피부밑 조직에 피하근육층이 존재하기 때문에 인간 피부와 단순 비교가 어렵다는 점이다. 조직학적 검사 상 실험군에서 대조군에 비해 피하근육층이 위축되어 있는 소견을 보였는데, 이로 인해 교감신경성 혈관수축을 방지하는 기전 외에도 물리적으로 공간이 넓어지는 효과로 인해 혈류를 증가시켰을 가능성이 있지 않을까 하는 추측도 가능하다.¹⁵ 둘째, 예비실험에서 각각 용량에 대해 2마리의 백서를 할당하여 실험하였는데, 보툴리눔 독신-A가 계획된 층보다 깊이 주사되었을 경우 근육층 위축만 심해지거나, 백서가 사망하거나, 피관 생존율에 영향을 미치지 못하는 경우가 있었다. 때문에 정확한 적정 용량을 찾기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 셋째로 노르에피네프린 감소 정도를 실험적으로 증명하지 못한 것이다. 이는 추후 면역조직화학염색이나 면역전기영동시험을 통해서 확인해야 할 것이다.

V. 결 론

백서의 배부에서 거상한 임의 피관에 보툴리눔 독신-A를 전처치함으로써 피관 혈류를 증가시켜 결과적으로 피관의 생존율을 향상시킬 수 있다.

REFERENCES

- Huemer GM, Wechselberger G, Otto-Schoeller A, Gurunluoglu R, Piza-Katzer H, Schoeller T: Improved dorsal random-pattern skin flap survival in rats with a topically applied combination of nonivamide and nicoboxil. *Plast Reconstr Surg* 111: 1207, 2003
- Cordivari C, Misra VP, Catania S, Lees AJ: New therapeutic indications for botulinum toxins. *Mov Disord* 19(Suppl 8): S157, 2004
- Bhidayasiri R, Truong DD: Expanding use of

- botulinum toxin. *J Neurol Sci* 235: 1, 2005
4. Rohrich RJ, Janis JE, Fagien S, Stuzin JM: The cosmetic use of botulinum toxin. *Plast Reconstr Surg* 112(5 Suppl): 177S, 2003
 5. Klein AW: The therapeutic potential of botulinum toxin. *Dermatol Surg* 30: 452, 2004
 6. Simpson LL: The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacol Rev* 33: 155, 1981
 7. Eleopra R, Tugnoli V, Quatralo R, Rossetto O, Montecucco C: Different types of botulinum toxin in humans. *Mov Disord* 19(Suppl 8): S53, 2004
 8. Rizo J, Södhof TC: Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Biol* 5: 839, 1998
 9. Brin MF: Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve Suppl* 6: S146, 1997
 10. Naumann M, Lowe NJ: Botulinum toxin type A in treatment of bilateral primary axillary hyperhidrosis: randomized, parallel group, double blind, placebo controlled trial. *BMJ* 323: 596, 2001
 11. Morris JL, Jobling P, Gibbins IL: Botulinum toxin A attenuates release of norepinephrine but not NPY from vasoconstrictor neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2627, 2002
 12. Morris JL, Jobling P, Gibbins IL: Differential inhibition by botulinum neurotoxin A of cotransmitters released from autonomic vasodilator neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2124, 2001
 13. Linderoth B, Gunasekera L, Meyerson BA: Effects of sympathectomy on skin and muscle microcirculation during dorsal column stimulation: animal studies. *Neurosurgery* 29: 874, 1991
 14. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE: Muscle flaps' Triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plast Reconstr Surg* 104: 730, 1999
 15. Celik E, Tercan M, Uzunismail A, Sağlam A: Versatility of botulinum toxin A: a use in stabilization of pedicled muscle flaps. *Plast Reconstr Surg* 117: 462, 2006