

## 가토모델에서 Lipo-PGE1이 복합조직이식편의 미세혈관신생에 미치는 영향

박지웅<sup>1</sup> · 어수락<sup>1</sup> · 조상헌<sup>1</sup> · 최종순<sup>2</sup> · 김어진<sup>2</sup>

동국대학교 의과대학 일산병원 성형외과학교실<sup>1</sup>, 병리학교실<sup>2</sup>

### *In-vivo* Studies on Effect of Lipo-PGE1 on Neoangiogenesis of Composite Graft in a Rabbit Model

Ji Ung Park, M.D.<sup>1</sup>, Su Rak Eo, M.D.<sup>1</sup>, Sang Hun Cho, M.D.<sup>1</sup>, Jong Sun Choi, M.D.<sup>2</sup>, Eo Jin Kim, M.D.<sup>2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Plastic and Reconstructive Surgery, <sup>2</sup>Pathology, Dongguk University Ilsan Hospital, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea

**Purpose:** The survival of composite graft is dependent on three steps, (1) plasmatic imbibitions, (2) inosculation, and (3) neovascularization. Among the many trials to increase the survival rate of composite graft, prostaglandin E1 (PGE1) has beneficial effects on the microcirculatory level with vasodilating, antithrombotic, anti-inflammatory and neoangiogenic properties. Lipo-PGE1 which is lipid microspheres containing PGE1 had developed to compensate the systemic and local side effects of PGE1. This study was proposed to determine whether Lipo-PGE1 administration enhanced the survival of composite graft through neovascularization quantitatively in a rabbit ear model.

**Methods:** Fourteen New Zealand White Rabbits each weighing 3~4 kg were divided in two groups: (1) intravenous Lipo-PGE1 injection group and (2) control group. A 2 × 1 cm sized, full-thickness rectangular composite graft was harvested in each auricle. Then, the graft was reapproximated in situ using a 5-0 nylon suture. For the experimental group, 3 µg/kg/day of Lipo-PGE1 (5 µg/mL) was administered intravenously through the marginal vein of the ear for 14 days. The control group was received no pharmacologic treatment. On the 14th postoperative day, composite graft of the ear was harvested and immunohistochemistry staining used Monoclonal mouse anti-CD 31 antibody was performed. Neoangiogenesis was quantified by counting the vessels that showed luminal structures surrounded by the brown color-stained epithelium and

counted from 10 random high-power fields (400x) by independent blinded observer. Statistical analysis (Wilcoxon Signed Ranks test for nonparametric data) was performed using SPSS v12.0, with values of  $p < 0.05$  considered significant.

**Results:** The mean number of the microvessels was  $15.48 \pm 8.65$  in the experimental group and  $9.82 \pm 7.25$  in the control group ( $p = 0.028$ ).

**Conclusion:** The use of Lipo-PGE1 facilitated the neoangiogenesis, resulted in the improvement of the survival rate of graft. On the basis of this results, we could support wider application of Lipo-PGE1 for more effective therapeutic angiogenesis and successful survival in various cases of composite graft in the human.

**Key Words:** Lipo-PGE1, Neovascularization

## I. 서 론

복합조직이식술 (composite graft)은 다양한 신체 부위에서 미용적, 재건 목적으로 흔히 시행되어지고 있는 술식으로 이의 생존율을 높이기 위한 많은 노력이 진행되고 있다. 이 식편의 생착은 보통 혈장흡수기 (plasma imbibition), 혈관 연결기 (inosculation), 혈관신생기 (neoangiogenesis)의 단계를 거쳐 이루어지고, 이 중 혈관신생기가 조직이식편의 생착에 중추적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Prostaglandin E1 (PGE1)은 항허혈, 항응고 및 혈관확장효과, 항염증효과 등으로 성형외과 영역에서 널리 사용되고 있지만,<sup>1,2</sup> 저혈압, 구토 등 전신적 부작용 및 주사 부위 통증, 부종 등의 국소적 부작용을 일으키고, 폐에서 쉽게 대사되어 불활화되는 단점을 가지고 있다.<sup>3</sup> PGE1에 미세지방구 (lipid microsphere)를 피복한 Lipo-PGE1은 PGE1의 약리학적 효과를 그대로 유지하면서 국소적, 전신적 부작용을 줄이고, 조직침투율과 생체흡수율을 향상시킨 장점을 가지고 있다.<sup>4</sup>

이에 본 연구에서는 가토모델을 통해 Lipo-PGE1이 미세혈관신생 및 조직이식편의 생착을 향상에 미치는 효과에 대해 규명함으로써, Lipo-PGE1의 인체 내 임상적 적용에 대한 이론적 근거를 제시하고자 한다.

Received February 26, 2010

Revised April 22, 2010

Accepted April 26, 2010

**Address Correspondence:** Su Rak Eo, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Dongguk University International Hospital, Goyang-si, Gyeonggi-do 411-773, Korea. Tel: 031) 961-7342/Fax: 031) 961-7347/E-mail: sre@duih.org

## II. 재료 및 방법

### 가. 실험기간 및 동물

2008년 11월부터 2009년 2월까지였으며, 체중 3~4 kg의 가토 (New Zealand White rabbit) 수컷 14마리를 사용하였고, 사료 및 사육조건은 동일하게 유지하였다. 본 연구는 동국대학교 일산병원 동물실험윤리위원회의 승인 후 시행되었다.

### 나. 실험방법

#### 1) 마취 및 복합조직이식편 제작

모든 실험동물은 5% Ketamine hydrochloride 60 mg/kg을 대퇴부에 근육주사하여 마취시킨 후 이개부의 털을 제거하고, 10% povidon iodine 용액으로 소독하였다. 양쪽 귀에서 주요 혈관주행 부위를 피해 2×1 cm의 크기의 직사각형 형태로 이식편을 도안한 후 전층에 걸쳐 절개를 가하여 이식편을 분리하여 채취하였으며, 이를 다시 원위치시켜 테두리가 최대한 잘 맞도록 5-0 nylon 봉합사를 이용한 복합조직이식술을 시행하였다 (Fig. 1). 술후 이식편의 건조 및 감염을 막기 위해 항생제 연고를 도포하였다. 술후 3일간 감염방지를 위해 Flumarin® (50 mg/kg) 항생제를 정맥주사하였다.

#### 2) 실험동물의 분류

총 14마리의 실험동물을 7마리씩 분류하여 약물투여를 시행한 실험군과 시행하지 않은 대조군으로 사용하였다.

#### 3) 약물의 주입

실험군 (n=7)에 대해서는 수술 당일부턴 이개부의 모서리 정맥 (marginal vein)을 통해 Lipo-PGE1 제제인 Eglandin®

(Welfide, Seoul, Korea)을 3 µg/kg/day의 양으로 14일간 매일 주사하였으며, 대조군 (n=7)에 대해서는 약물투여를 시행하지 않았다.

### 다. 면역조직화학 검사

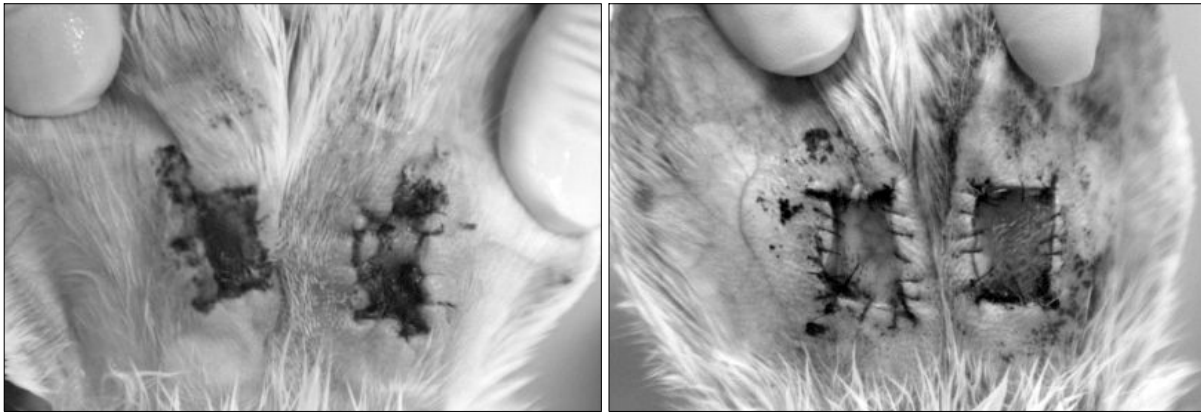
술후 14일째 양쪽 이개부로부터 이개부 자가복합조직이식편의 봉합 부위를 따라 절개 분리하여 이를 채취하였고 (Fig. 2), 채취한 조직은 즉시 10% 중성 포르말린에 고정한 후 조직 테두리로부터 0.5 cm 부위에서 4 µm 두께의 파라핀 포매조직절편을 만들었으며, 탈파라핀 및 함수과정을 거치도록 하였다. 이후 내재성 peroxidase를 억제하기 위해 3% hydrogen peroxidase에 반응시킨 후 조직항원이 잘 노출되도록 microwave 처리를 하였다. 일차항체인 단클론 마우스 항 CD31 (DAKO, Glostrup, Denmark)을 1:30으로 희석하여 30분간 실온에서 반응시킨 후 완충액으로 세척하고, 이차항체인 항 마우스 면역글로불린 (goat anti-mouse immunoglobulin; DAKO, Glostrup, Denmark)과 실온에서 30분간 반응시켰으며 이를 완충액으로 충분히 세척하였다. 또한 DAB (Diaminobenzidine)를 이용해 발색반응을 일으킨 후 헤마톡실린으로 대조염색하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 각각의 슬라이드 당 400배 배율에서 무작위로 10군데의 고배율 시야 (HPF)를 선정한 후 맹검자에 의해 신생혈관의 숫자를 산정하고 이를 평균하여 실험군과 대조군을 비교하였다.

### 라. 통계적 분석

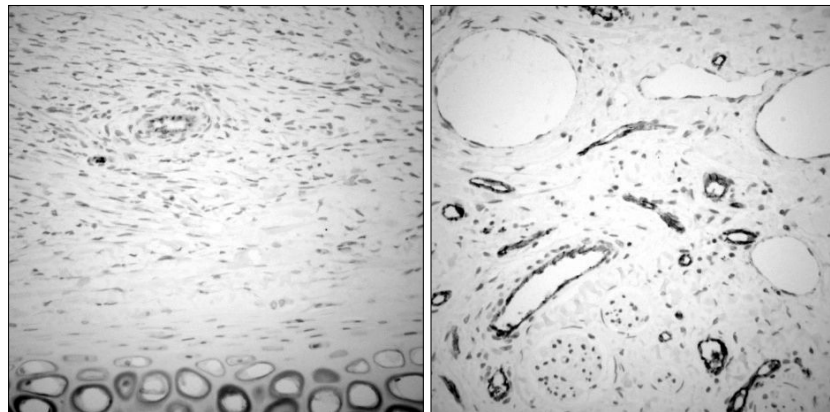
신생혈관숫자에 대한 통계분석을 위해 Window용 SPSS (V12.0) 통계프로그램을 이용하여 비모수 검정법인 Wilcoxon Signed Ranks test를 실시하였으며, p값이 0.05이하인 것을 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.



**Fig. 1.** Gross photograph of the composite graft of the ear. (Left) A 2×1 cm sized, full thickness graft was harvested. (Right) The graft was replaced and reapproximated using a 5-0 nylon suture.



**Fig. 2.** Representative examples of the graft survival area in each group after 14th postoperative day. (Left) Control group. (Right) Experimental group.



**Fig. 3.** Representative high-power (original magnification, ×400) photomicrographs of anti-CD31 immunohistochemistry in the composite graft of the ear. New microvessels which are luminal structures lined by brown stained CD31 positive endothelial cells were observed. (Left) Control group. (Right) Experimental group.

### III. 결 과

현미경적 조직사진 소견 상 신생미세혈관은 CD31 양성으로 내강을 형성하고 있는 갈색으로 염색되어 관찰되었다 (Fig. 3). 실험군에서 평균  $15.48 \pm 8.65$ , 대조군에서는 평균  $9.82 \pm 7.25$ 의 신생혈관이 관찰되었다. 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 신생혈관의 수가 증가되어 있었다 ( $p=0.028$ ) (Table I).

### IV. 고 찰

복합조직이식술 (composite graft)은 1946년 Brown에 의해 귀피부연골복합조직이식술로 처음 기술된 이래 수지첨부, 이개부, 비부 등 다양한 신체 부위에서 행해지고 있다. 특히, 수지첨부 절단 시 복합조직이식술은 문합하기에 너무 작은 혈관 크기로 재접합이 불가능할 경우 이차적으로 수지

**Table I.** Statistical Analysis of the Mean Number of New Microvessels from 10 Random High Power Field (×400) in Each Composite Graft of the Ear

	Control (N)	Experimental (N)
1	14.9	22.9
2	11.5	22.33
3	4.75	12.5
4	7	17.6
5	2.5	4
6	23.1	24.5
7	5	4.5
Mean ± SD*	$9.82 \pm 7.25$	$15.48 \pm 8.65$
<i>p</i> value		0.028

\*SD, standard deviation.

길이의 보존과 기능적, 미용적 개선을 목적으로 성형외과 영역에서 흔히 시행되어지고 있으며, 이식까지의 시간, 절단 부위, 손상된 조직의 상태, 환자의 나이 등이 이식편의 생존에 있어 중요한 예후 인자들로 거론되고 있다. 복합조직이식편의 생착은 보통 혈장흡수기, 혈관연결기, 혈관신생기의 3 단계를 통해 이루어지는데, 최대 1 cm의 크기가 허용한도치로 알려져 있다. 특히 평균 3~4일이 지나면서 혈관신생이 일어나고, 이 과정이 가장 중요한 요소로서 이식편의 성공에 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 복합조직이식편의 생착 성공률을 높이기 위한 다양한 시도들이 이루어지고 있으며, 약물학적 요법으로 corticosteroid, dimethylsulfoxide, heparin 등이 시도되고 있고, 이외에 습윤드레싱, 냉각요법 (ice-cooling), 고압산소요법 등이 보고된 바 있다. 그러나 여전히 이식편의 생착 성공에 대한 예측이나 이에 영향을 미치는 요소에 대한 논란 및 연구가 지속되고 있다.

PGE1은 항혈액, 항응고, 혈관확장작용, 항염증효과, 중성구로부터 superoxide 생산을 감소시키는 효과를 가지고 있어 말초혈관질환이나 재접합술, 국소 및 유리피판술, 허혈성 질환 등에 있어 효과적인 약물치료법으로 알려져 있다. 하지만, 폐에서 쉽게 대사되는 단점 등이 있어 PGE1에 미세지방구를 피복하여 폐내 불활화율을 최대한 낮춤으로써 약물의 효율을 높이고, 조직침투율 및 생체흡수율을 향상시킨 Lipo-PGE1이 개발되어 성형외과 영역에서 각광받고 있다. 하지만, 복합조직이식편과 관련된 PGE1의 구체적인 효과에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

치료적 혈관신생 (therapeutic angiogenesis)은 특정물질 또는 환경의 적용으로 유발되는 새로운 혈관의 증가 혹은 감소를 의미하며, 크게 두 가지 기전이 관여하는 것으로 알려져 있다. 첫째, 기저막 (basal membrane)의 내피세포가 중요한 요소로서, 이의 재배열 후 측방발아 (lateral sprouting) 혈관신생 기전이 있다. 발아과정 (sprouting process)은 다음과 같은 단계를 통하여 이루어진다. 혈관확장 및 내피세포의 이주 (migration)를 위한 골격 (scaffold)을 제공하는 혈장단백질의 삼출, 세포의 MMPs (matrix metalloproteinases)에 의한 기저막으로부터 내피세포의 분리, 내피세포의 이주 및 관형성 (tube formation), 삼차원적 구조로의 내피세포의 안정화 (stabilization) 및 재배열 (remodeling)을 통한 신생혈관의 형성, 불필요한 미세혈관의 퇴화 등이다. 두 번째로는 반대측면의 두개의 기저막이 접촉지역 (zone of contact)을 형성한 후 내피세포가 결합하고 내강분리 (luminal division)를 이룬 후 근섬유세포 등의 축적으로 세포의 기질이 형성되어 새로운 혈관을 형성하는 분열혈관신생 (splitting angiogenesis) 기전이 있다.<sup>67</sup> 이러한 혈관신생은 다양한 사이토카인 (cytokine)이나 성장인자 (growth factor)를 통해 촉진되는 것으로 보고되어졌다. Seify 등<sup>8</sup>은 VEGF (vascular

endothelial growth factor)를 가장 강력한 혈관신생촉진인자로 보고하였으며, Marra 등<sup>9</sup>은 FGF (fibroblast growth factor)-2가 지방세포이식 시 혈관신생 및 세포생존을 향상시킨다고 보고한 바 있다. 이외에도 HGF (hepatocyte growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), IGF (insulin-like growth factor), human erythropoietin, fibrin 등이 혈관신생을 촉진하는 매개물로 알려져 있다.<sup>10-12</sup>

Lipo-PGE1은 직접적으로 혈관신생에 관여한다기보다는 위의 매개물들의 발현에 영향을 미쳐 혈관신생을 촉진하는 것으로 여겨진다.<sup>13</sup> Gensch 등<sup>14</sup>은 PGE1이 PI3-kinase mediated apoptosis의 감소를 통해 EPC (endothelial progenitor cell) 기능을 활성화함으로써 혈관형성을 촉진한다고 보고하였으며, Mehrabi 등<sup>15</sup>은 PGE-1이 강력한 혈관신생촉진인자인 VEGF의 발현을 증가시켜 혈관신생을 향상시킨다고 보고하였다. 비록 본 연구에서 Lipo-PGE1을 사용한 실험군에서 대조군에 비해 명확하게 조직이식편의 혈관신생이 증가함을 관찰할 수 있었다 할지라도 Lipo-PGE1이 어떠한 매개물질의 발현에 영향을 미쳐 이러한 결과를 유도하였는지는 규명하지 못하였다. 즉, 조직이식편에서 Lipo-PGE1과 위에 언급한 혈관신생촉진인자간의 상관관계에 대해서는 명확히 밝힐 수 없었으며, 이 부분에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

성형외과 영역에서 빈번하게 사용되어지는 복합조직이식편의 생존에 있어 혈관신생은 가장 중요한 요소라고 할 수 있다. 본 연구에서는 말초혈관질환 및 피판술 등에 주로 사용되었던 Lipo-PGE1의 복합조직이식편에 대한 혈관신생효과를 증명하기 위해, 가토를 이용하여 이개복합조직이식모델을 사용하였다. 비록, Lipo-PGE1과 혈관신생촉진인자와의 관계에 대해서는 규명하지 못하였다 할지라도, Lipo-PGE1을 투여한 실험군이 대조군에 비해 면역조직화학염색 결과 우수한 혈관신생효과를 나타내는 것으로 관찰되었으며, 이를 토대로 Lipo-PGE1이 인체 내 다양한 복합조직이식편의 생착을 향상 위해 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Koga T, Az-ma T, Yuge O: Prostaglandin E1 at clinically relevant concentrations inhibits aggregation of platelets under synergic interaction with endothelial cells. *Acta Anaesthesiol Scand* 46: 987, 2002
2. Fantone JC, Kinnes DA: Prostaglandin E1 and prostaglandin I2 modulation of superoxide production by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 113: 506, 1983

3. Rodriguez Vegas JM, Ruiz Alonso ME, Teran Saavedra PP: PGE-1 in replantation and free tissue transfer: early preliminary experience. *Microsurgery* 27: 395, 2007
4. Mizushima Y, Yanagawa A, Hoshi K: Prostaglandin E1 is more effective, when incorporated in lipid microspheres, for treatment of peripheral vascular diseases in man. *J Pharm Pharmacol* 35: 666, 1983
5. Lewis D, Goldztein H, Deschler D: Use of hyperbaric oxygen to enhance auricular composite graft survival in the rabbit model. *Arch Facial Plast Surg* 8: 310, 2006
6. Madeddu P: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 90: 315, 2005
7. Moreschi D Jr, Fagundes DJ, Hernandez L, Haapalainen EF: Effects of prostaglandin E(1) in the genesis of blood capillaries in the ischemic skeletal muscle of rats: ultrastructural analysis. *Ann Vasc Surg* 22: 121, 2008
8. Seify H, Bilkay U, Jones G: Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg* 112: 1032, 2003
9. Marra KG, Defail AJ, Clavijo-Alvarez JA, Badylak SF, Taieb A, Schipper B, Bennett J, Rubin JP: FGF-2 enhances vascularization for adipose tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 121: 1153, 2008
10. Kim EK, Hong JP: The effect of recombinant human erythropoietin on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat TRAM flap model. *Plast Reconstr Surg* 120: 1774, 2007
11. Fan CL, Gao PJ, Gu YJ, Tang XF, Liu JJ, Wei J, Inoue K, Zhu DL: Therapeutic angiogenesis by intramuscular injection of fibrin particles into ischaemic hindlimbs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 617, 2006
12. Huang Y, Marui A, Sakaguchi H, Esaki J, Arai Y, Hirose K, Bir SC, Horiuchi H, Maruyama T, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M: Sustained release of prostaglandin E1 potentiates the impaired therapeutic angiogenesis by basic fibroblast growth factor in diabetic murine hindlimb ischemia. *Circ J* 72: 1693, 2008
13. Weiner R, Kaley G: Influence of prostaglandin E1 on the terminal vascular bed. *Am J Physiol* 217: 563, 1969
14. Gensch C, Clever Y, Werner C, Hanhoun M, Bohm M, Laufs U: Regulation of endothelial progenitor cells by prostaglandin E1 via inhibition of apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 42: 670, 2007
15. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, Pacher R, Horvath R, Mall G, Glogar HD: Clinical benefit of prostaglandin E1-treatment of patients with ischemic heart disease: stimulation of therapeutic angiogenesis in vital and infarcted myocardium. *Biomed Pharmacother* 57: 173, 2003