

쥐에서 대퇴 동맥 문합술시 투여한 혈관내피성장인자의 효과에 대한 형태학적 연구

전북대학교 의과대학 정형외과학교실

이준모 · 이영근

— Abstract —

A Morphologic Study on the Effect of the Vascular Endothelial Growth Factor in the Anastomosis of the Rat Femoral Artery

Jun-Mo Lee, M.D., Young-Keun Lee, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Korea

Purpose: This study evaluated the effect of VEGF in the arterial anastomosis by using light and electron microscopy.

Materials and method: Rats underwent femoral arterial end-to-end anastomosis after transection and topical VEGF treatment. The proximal and distal segments of the femoral arteries was drenched with 1 drop of VEGF (100 ng/100 μ l/bottle). and when half of the repair was finished, the other 1 drop was drenched and then the repair was continued to complete the anastomosis. Gross and histologic characteristics of arterial wall were assessed after 3 days, 1, 3 and 5 weeks. In the control group, normal saline solution instead of VEGF was dropped with the same method in the anastomosis.

Results: The histologic findings of the arterial wall were the vascular remodeling with the infiltration of inflammatory cells at early stages and the tissue fibrosis at lately stages in the anastomotic sites of the control and the VEGF-treated groups. The scanning electron microscopic results were; (1) the anastomotic sites were covered by many irregular cells with long cytoplasmic processes at the early stages. (2) After 1 week, endothelial cells started to cover the anastomotic sites. (3) After 3 weeks, the anastomotic sites were partially covered by endothelial cells in the control group. (4) After 5 weeks, the anastomotic sites were completely covered by endothelial cells in the control and VEGF-treated groups. (5) In the VEGF-treated group, the anastomotic site was completely covered by endothelial cells which directed parallel to longitudinal axis of arteries after 3 weeks.

Conclusion: Topical VEGF maintained luminal integrity by decreasing fibrosis and increasing re-endothelialization. These findings suggest that topical VEGF may be a promising new strategy

※통신저자: 이 준 모

전라북도 전주시 덕진구 금암동 634-18

전북대학교 의과대학 정형외과학교실

Tel: 82-63-250-1769, Fax: 82-63-271-6538, E-mail: junmolee@chonbuk.ac.kr

* 제48차 대한정형외과 추계학술대회에 구연되었음.

to enhance healing and improve the outcome of vascular anastomosis.

Key Words: Rat femoral artery anastomosis, VEGF

I. 서 론

미세혈관문합술로는 단순봉합에 의한 단단문합술이 가장 널리 이용되고 있으나 몇 가지 임상적 문제점들이 있어 혈관의 근위부말단을 원위부내로 합입시키는 Sleeve 혈관문합술도 시도되고 있다.¹² 단단문합술은 수술시간이 길며, 수술수기가 어렵고, 봉합부위에서 봉합사에 의하여 혈관벽에 손상을 받는 내피손상과 봉합사가 혈전유발물질로 작용하여 혈전이 형성된다. 특히, 동맥혈관의 횡절단으로 혈관에 혈액을 공급하는 외막의 혈관벽 혈관(adventitial vasa vasorum)이 손상되어 봉합부위에 국소적인 저산소증이 유발되며,^{1,9} 이는 동물실험에서 단단문합술 후 약 2주까지 손상된 동맥벽의 저산소증이 지속된다고 보고되었다.⁸

최근에 저산소증 조절 당단백질인 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, Human VEGF165)는 VEGF수용체-1과 VEGF수용체-2에 작용하는 강력한 혈관생성인자로 주로 대식 세포와 섬유모세포에서 분비되며 조직 치유에 관여한다고 알려져 있다.^{3,4,14}

이에 저자는 현재까지 봉합 혈관에 국소적으로 사용된 바 없는 혈관내피성장인자를 쥐의 대퇴동맥 단단문합술 시 봉합 부위에 점적한 후, 혈관 내막을 포함하여 혈관벽의 회복과정을 형태학적으로 관찰하여 혈관내피성장인자가 혈관벽의 재건에 미치는 효과를 구명하고자 이 연구를 실시하였다.

II. 연구대상 및 방법

가. 실험동물

체중이 320~360 g (평균 약 348 g) 정도의 성숙하고 건강한 수컷 쥐(Sprague-Dawley rat) 45마리를 사용하였다. 정상군은 5마리를, 실험군과 대조군은 각각 20마리를 사용하였다. 정상군은 아무런

처치를 하지 않았고, 실험군은 대퇴동맥을 자른 후 혈관내피성장인자(Human Vascular Endothelial Growth Factor, Human VEGF165: RnD Systems, USA)를 점적하고 문합술을 시행하였다.

나. 실험방법

마취는 실험동물을 밀폐된 용기 내에서 에테르를 흡입시켜 유도한 후, ketamine(염산케타민 50 mg/ml, 유한양행)과 Rompun[®](xylazine hydrochloride 23.32 mg/ml, 바이엘 코리아)의 5:1 혼합액(v:v) 1 ml를 근육 주사하여 마취를 유지하였다. 양와위 상태에서, 쥐의 우측 대퇴동맥을 서혜부 인대로부터 약 2.0 cm 이상을 노출시켰다. 혈관 감자(vessel clamp)를 위치시킨 후 미세수술용 가위를 이용하여 대퇴동맥을 완전히 절단하고 동맥 단단에 혈관내피성장인자(100 ng/100 μ /bottle) 1 방울을 떨어뜨려 충분히 적신 후 봉합술을 시작하였다. 10.0 Ethiolon 봉합사 (Johnson & Johnson, Medical Korea)를 이용하여 동맥 단단의 약 50%를 봉합하고 다시 1방울을 떨어뜨리고 단단 봉합을 완성하였다. 혈관 감자를 제거하여 혈류를 재관류시켜 개존성을 확인하였다. 술 후 3일과 1주, 3주, 5주에 각각 5마리씩 희생시켜 문합부 혈관을 육안적으로 보고, 광학 및 주사전자현미경으로 조직학적 변화를 관찰하였다.

다. 현미경 관찰방법

문합부위를 포함한 8~10 mm 길이의 혈관을 얻어 혈관내벽을 heparinized saline으로 깨끗이 닦아낸 후, 현미경하에서 혈관을 종축을 따라 절개하여 내막을 노출시켰다. 절개된 한쪽 혈관은 10% 포르말린으로 고정된 후 통상적인 탈수와 파라핀포매 과정을 거쳐 박절기로 5 μ m 두께의 절편을 만들어 헤마톡실린과 에오신 염색을 시행한 다음 광학현미경(VANOX-T, Olympus, Japan)으로 혈관벽의 조직학적 변화

를 관찰하였다. 절개된 반대쪽 혈관은 2% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde (0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 전고정후 1% osmic acid (O_5O_4)로 2시간 동안 후고정하였다. 에탄올(ethanol)의 농도를 점차 높여가면서(50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 탈수과정을 거쳐 건조시킨후, 건조된 혈관을 specimen holder에 부착시키고 gold sputter coater (Ladd 30800)에서 90초간 도금하여 주사전자현미경(JEOL JSM-T330A, Japan)으로 혈관 내강구조와 내피표면을 관찰하였다.

III. 결 과

가. 육안적 소견

문합에 사용한 대퇴동맥의 외경은 평균 1 mm 정도이었다. 술후 혈관문합부위의 절개시 주위조직과 문합부와 유착을 보였는데, 술후 3일과 1주일 이 경과된 경우에서 적었으나, 술후 3주와 5주일 이 경과된 경우에서 좀 더 심하여 혈관을 노출시키기 힘들었고, 문합부는 백색반흔조직으로 덮혀 유착되어 있었으나, 유착제거술후 문합부위의 개존성 검사는 가능하였다.

나. 광학현미경적 소견

정상적인 대퇴동맥벽은 3층으로 이루어져 있었다

(Fig. 1A). 가장 안쪽에 한 층의 내피세포와 내피하층으로 이루어진 내막과 중간에 위치하며 평활근 세포로 이루어진 두꺼운 중막, 바깥쪽의 작은 혈관들이 포함된 결합조직으로 이루어진 외막으로 각 층 사이에는 띠모양의 섬유들이 배열되어 3층이 뚜렷하게 구분되었다 (Fig. 1A). 문합술을 시행한 대퇴동맥벽의 중막에서 봉합사들이 많이 관찰되었고, 봉합사 주위에서 많은 염증세포들과 섬유화 조직들이 관찰되었다(Fig. 1B-H). 문합술을 시행한 대퇴동맥벽에서 관찰된 염증세포들의 침윤(infiltration of inflammatory cells)은 수술 후 3일군(Fig. 1B)과 1주군(Fig. 1D)에서 많이 관찰되었고, 섬유화는 3주(Fig. 1F)와 5주군(Fig. 1H)에서 많이 관찰되었다. 문합술시 혈관내피성장인자를 투여한 경우 이러한 염증세포의 침윤과 섬유화가 감소되는 경향을 보였다(Fig. 1C, E, G, I).

다. 주사전자현미경적 소견

정상적인 대퇴동맥의 내강면은 방추형의 내피세포들이 동맥의 장축을 따라 치밀하게 배열되어 있었다. 내피세포들은 세포 간 고랑에 의하여 경계되어 있었고, 핵이 위치한 세포의 중간부분이 내강쪽으로 볼록하게 돌출되어 있었으며, 세포의 표면은 비교적 평평하였다 (Fig. 2A). 문합술을 시행한 대퇴동맥의 내

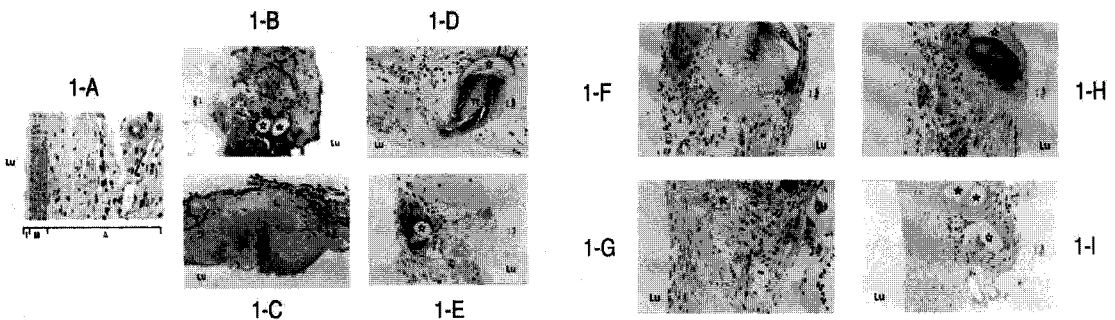


Fig. 1. Light micrographs of the arterial walls adjacent to the anastomotic sites in the rat femoral arteries. Hematoxylin and Eosin stain; Bars: 10 μ m; Stars: silk; Lu=lumen; Tf: tissue fibrosis
 (A) The normal wall of femoral artery is divided into three layers: the tunica intima (I), tunica media (M), and tunica adventitia (A). (B) and (C) Three days after vascular anastomosis treated with normal saline (B) or vascular endothelial growth factor (VEGF) (C). (D) and (E) One week after vascular anastomosis treated with normal saline (D) or VEGF (E). (F) and (G) Three weeks after vascular anastomosis treated with normal saline (F) or VEGF (G). (H) and (I) Five weeks after vascular anastomosis treated with normal saline (H) or VEGF (I).

강면에서 내강쪽으로 돌출된 봉합사들이 관찰되었다. 수술 후 3일이 경과된 경우 봉합사 주변의 내강면에서 불규칙한 주름들과 동맥을 봉합한 선이 관찰되었다 (Fig. 2B-E). 돌출된 봉합사 표면과 동맥의 내강면에서 많은 세포질 돌기들이 있는 별 모양의 세포들이 관찰되었다. 수술 후 1주일이 경과된 경우 내강면의 불규칙한 주름들은 관찰되지 않았고, 내피세포들은 불규칙한 방향으로 배열되었으며 세포간 넓은 틈새들이 관찰되었다 (Fig. 2F-I). 수술 후 3주 (Fig. 2J-M)와 5주 (Fig. 2N-Q)가 경과된 경우 내강쪽으로 돌출된 봉합사의 표면에 내피세포들이 부착되어

봉합사는 관찰되지 않았고, 방추형 또는 띠모양의 내피세포들이 동맥의 장축을 따라 치밀하게 배열되어 있었다. 문합술시 혈관내피성장인자를 투여한 경우 증식된 내피세포들로 인하여 봉합에 의한 내강면의 불규칙한 주름들과 봉합선, 내강면에 돌출된 봉합사들이 소실되었다(Fig. 2H, I, L, M, P, Q).

IV. 고 찰

혈관의 치유과정에 대한 형태학적 연구로는 McCabe 등¹⁰은 개의 대퇴동맥에 복재정맥을 이식한

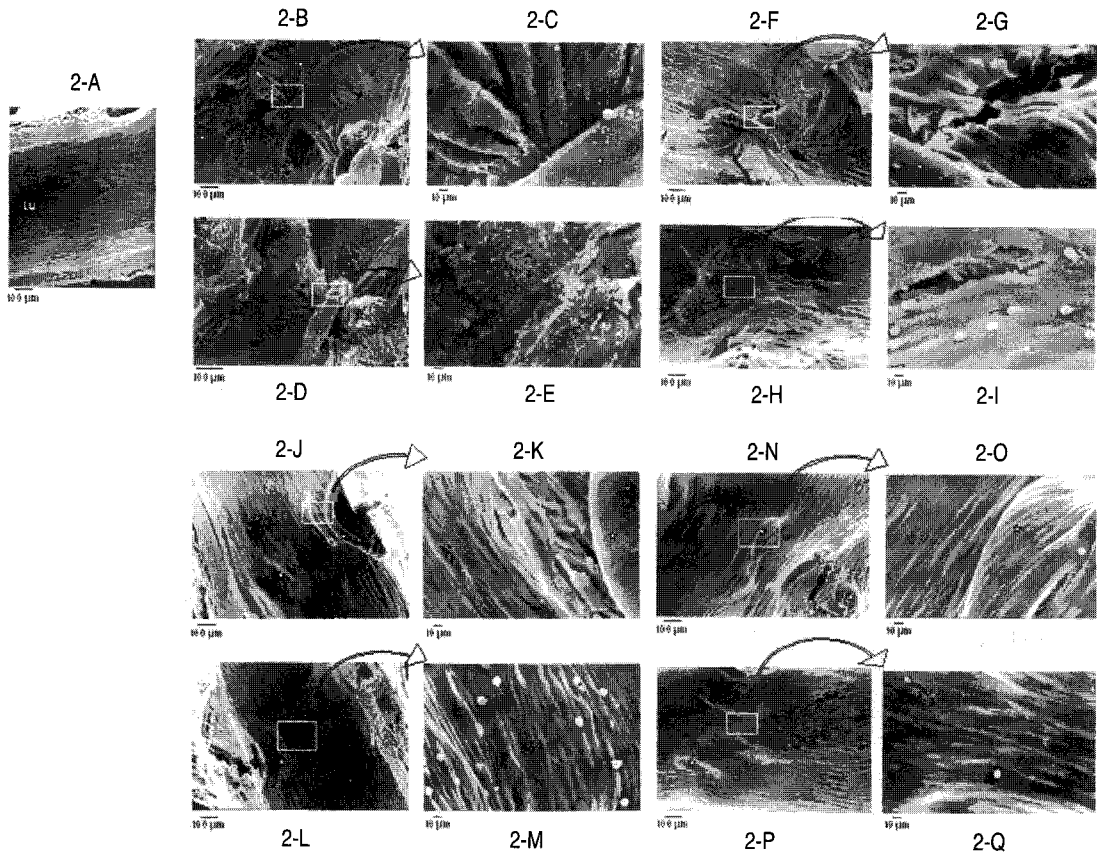


Fig. 2. Scanning electron micrographs of the arterial luminal surface adjacent to the anastomotic sites in the rat femoral arteries. Bars: 10 or 100 μm ; Stars: silk; Lu=lumen
(A) The normal luminal surface of femoral artery. **(B)** and **(C)** Three days after vascular anastomosis treated with normal saline **(B)** and **(C)** or VEGF **(D)** and **(E)**. **(D)** and **(E)** One week after vascular anastomosis treated with normal saline **(F)** and **(G)** or VEGF **(H)** and **(I)**. **(F)** and **(G)** Three weeks after vascular anastomosis treated with normal saline **(J)** and **(K)** or VEGF **(L)** and **(M)**. **(H)** and **(I)** Five weeks after vascular anastomosis treated with normal saline **(N)** and **(O)** or VEGF **(P)** and **(Q)**.

후 초기에는 손상으로 인해 내막이 소실되고 혈소판 응집 및 가상내막(pseudointima) 형성이 되면서 염증세포의 침윤이 있고 후기에 거대식세포가 나타나며 내막의 섬유조직의 증식과 내피세포의 출현으로 재생됨을 관찰하였다. Wiman 등¹⁵은 내피세포의 소실은 문합부에 국한되었고 동맥 보다 정맥에서 소실이 심했고, 내피세포의 재생은 7~10일째 이루어진다고 하였다.

저자는 문합술 후 3일과 1주군에서 문합부에 많은 염증세포의 침윤을 관찰하였고 술후 1주군에서 섬유성조직 응고물을 관찰하였으며, 3주군에서는 완전한 내막재생 및 내피세포의 연속성을 관찰할 수 있었다.

내피세포재생에 대한 연구로는 Poole 등¹¹은 내피세포가 손상된 부위에 혈소판과 백혈구응집이 있는 후 서서히 주위 정상 내피세포의 유사분열에 의해 재생된다고 하였고, 미세혈관 문합술에 관련된 혈관 내막의 주사전자현미경적 소견을 관찰한 보고는 1970년대 부터 이루어 졌다. 1970년 Shoop 등¹³은 주사전자현미경을 이용하여 흰쥐의 장골동맥에서 초기 지혈반응을 관찰하였다. 그에 의하면 고속 혈류를 지닌 혈관에서의 초기 지혈은 혈소판들이 손상된 내피세포와 내막하 교원질(subendothelial collagen)에 유착되어 이루어지며, 그 후로는 다른 혈소판들이 이미 유착된 혈소판과 주위의 정상적인 형태의 내피세포들에 유착되어 간다고 하였다.

Harashina 등⁶은 백서의 대퇴동맥을 문합하는데, 양측의 bite의 정도를 달리함으로써 그 개존율(patency rate)과 혈액유출, 그리고 치유과정의 차이 등을 관찰 비교하였다. 그들에 의하면, 1주가 지나면 부분적인 내막의 재생이 일어나며, 2주면 완전히 내막이 치유된다고 하였고, bite 정도에 따른 개존율의 차이는 없었고 단지 문합 직후의 혈액유출의 양에만 다소의 차이가 있었을 뿐, 주사전자현미경으로 본 치유과정은 유사하다는 결론을 얻었다.

미세혈관 문합시 대개 그 표면 직경은 1.0 mm 정도였고, 1975년 Hayhurst와 O'Brien⁷ 1.0 mm 내외의 동·정맥을 문합하여 92~100%의 개존율을 보고하였으며, 그들은 또한 미세혈관 문합시 개존율을 좌우하는 것으로는 술기의 정확성이 가장 중요한 요인이 된다고 하였다.

본 실험에서는 표면 직경이 1.0 mm 정도 되는 대퇴동맥을 문합하여 시기별로 관찰하였다. 문합술 초

기에는 대퇴동맥의 내강쪽으로 돌출된 봉합사들이 관찰되었으며 술 후 3일이 경과된 경우 봉합사 주변의 내강면에서 불규칙한 주름들이 관찰되었다. 돌출된 봉합사 표면과 동맥의 내강면에서 많은 세포질 돌기들이 있는 별 모양의 세포들이 관찰되었다. 수술 후 1주일이 경과된 경우 내강면의 불규칙한 주름들은 관찰되지 않았고, 내피세포들은 불규칙한 방향으로 배열되었으며 세포간 넓은 틈새들이 관찰되었다. 수술 후 3주와 5주일이 경과된 경우 내강쪽으로 돌출된 봉합사의 표면에 내피세포들이 부착되어 봉합사는 관찰되지 않았고, 방추형 또는 띠모양의 내피세포들이 동맥의 장축을 따라 치밀하게 배열되어 있었다.

동맥문합술 시 혈관 문합부에 저산소증이 유발된다는 것은 이미 잘 알려져 있다.^{1,8,9} 저자는 본 연구에서 저산소증을 조절하며 혈관생성을 촉진하는 물질인 혈관내피성장인자를 문합술 후 점적하고 혈관벽의 치유과정을 형태학적으로 관찰하였다. 문합부에 VEGF의 국소적인 점적은 혈관벽의 염증세포의 침윤과 조직섬유화를 억제하여 혈관벽의 remodeling을 감소시키고, 내피세포의 증식을 유발시켜 혈관벽의 회복시킴을 관찰하였다. 최근에 혈관내피성장인자는 혈관내피세포의 cadherin과 β -catenin, PI3-kinase, VEGFR-2 를 통하여 내피세포의 생존을 유도한다고 보고되었다.^{2,5,16} 또한, 혈관내피성장인자는 내피세포로부터 산화질소(nitric oxide)와 prostacyclin의 생성을 촉진하여 혈관을 보호하는 기능이 있다고 보고되었다.¹⁶

저자의 실험결과에서 혈관내피성장인자를 처리한 경우에 생리적 식염수를 처리한 대조군에 비하여 내피세포의 증식이 빠르게 진행되었다. 이는 점적한 혈관내피성장인자에 기인한 것으로 생각된다. 그러나 저자의 연구에서 혈관내피성장인자가 대퇴동맥 문합부근의 정상 내피세포의 증식을 유발한 것인지, 손상된 내피세포의 재생을 유도한 것인지는 불분명하다. 혈관내피성장인자를 국소 도포한 후 혈관내막의 thickening을 현저하게 감소시켜 re-endothelialization을 촉진하였다는 보고²로 미루어, 혈관내피성장인자가 문합술 시 내피세포의 증식에 관여하는 것은 분명하다고 생각된다. 앞으로 혈관내피성장인자가 혈관을 보호하고 내피세포의 증식을 유도하는 정확한 기전 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

쥐에서 대퇴동맥 문합술시 혈관내피성장인자를 투여한 경우 혈관벽의 섬유화를 감소시키고 내피세포의 증식을 증가시켜 혈관의 본래모습 (integrity)을 유지시켰다. 이러한 결과는 혈관내피성장인자가 혈관의 문합술시 혈관의 정상적인 회복을 촉진할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문 작성시 많은 도움을 주신 해부학교실 송창호 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

- 1) Backer CL, Mavroudis, Zias EA, Amin Z, Weigel TJ: *Repair of coarctation with resection and extended end-to-end anastomosis. Ann Thorac Surg* 66:1365-1370, 1998.
- 2) Carmeliet P, Collen D: *Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. Curr Top Microbiol Immunol* 237:133-158, 1999.
- 3) Dodge-Khatami A, Niessen HWM, Baidoshvili A, van Gulik TM, Klein MG, Eijnsman L, de Mol BAJM: *Topical vascular endothelial growth factor in rabbit tracheal surgery: comparative effect on healing using various reconstruction materials and intraluminal stents. Eur J Cardio-thorac* 23:6-14, 2003.
- 4) Ferrara N: *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. J Mol Med* 77:527-543, 1999.
- 5) Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem* 273:30336-30343, 1998.
- 6) Harashina T, Fujino T, Watanabe S: *The intimal healing of microvascular anastomosis. Plast Reconstr Surg* 58:608-613, 1976.
- 7) Hayhurst JW, O'Brien BM: *An experimental study of microvascular technique, patency rates and related factors. Br J Plast Surg* 28:128-132, 1975.
- 8) Kivisaari J, Niinikoski J: *Oxygen tensions in healing anastomosis of rabbit aorta. Surgery* 78:165-175, 1975.
- 9) Martin JF, Booth RF, Moncada: *Arterial wall hypoxia following thrombosis of the vasa vasorum is an initial lesion in atherosclerosis. Eur J Clin Invest* 21:355-359, 1991.
- 10) McCabe M, Cunningham GJ, Wyatt AP, Rothnie NG, Taylor GW: *A histological and histochemical examination of autogenous vein grafts. Br J Surg* 54:147-155, 1967.
- 11) Poole JCF, Sanders AG, Florey HW: *The regeneration of aortic endothelium, J Pathol Bacteriol* 75:133-143, 1958.
- 12) Shim YK, Oh SJ, Lee SI, Lew JD: *Histologic study on sleeve microvascular anastomosis. J Plast Surg Kor* 10:141-150, 1983.
- 13) Shoop R, Balcerzak SP, Larrimer NR, Lee RE: *Surface morphology of the early hemostatic reaction. Am J M Sci* 260:122-129, 1970.
- 14) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature* 359:843-845, 1992.
- 15) Wiman D, Ostrup LT, Enestrom S: *The effect of dextran on the incidence of thrombosis in microvenous Nakayama ring pin anastomoses. Including studies on the histopathology of Nakayama anastomoses. Scan J Plast Reconstr Surg* 13:263-268, 1979.
- 16) Zachary I: *Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1375-1386, 2001.