

흰쥐의 복직근피부피관에 일으킨 허혈-재관류 손상에서 CD18의 발현

윤상엽¹ · 이택종² · 홍준표²

바람성형외과¹, 서울아산병원 울산대학교 의과대학 성형외과학교실²

The Expression of CD 18 on Ischemia-Reperfusion Injury of TRAM Flap of Rats

Sang Yub Yoon, M.D.¹, Taik Jong Lee, M.D.²,
Joon Pio Hong, M.D.²

¹Baram Clinic BBC, Seoul, Korea,

²Asan Medical Center, Department of Plastic Surgery,
University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: This study was to evaluate the expression pattern of CD 18(leukocyte adhesion glycoprotein) in ischemia-reperfusion injury of TRAM flap of rats. Through this study, we can obtain more information about ischemia-reperfusion injury. We want to develop specific medicine to improve the survival rate of TRAM flap in the future.

Methods: A TRAM flap supplied by a single pedicle superior epigastric artery and vein was elevated on 60 Sprague-Dawley rats. The rats were divided into 6 groups (each group n=10); Group O: sham, no ischemia-reperfusion injury, Group I: 2 hour reperfusion after 4 hour ischemia, Group II: 4 hour reperfusion after 4 hour ischemia, Group III: 8 hour reperfusion after 4 hour ischemia, Group IV: 12 hour reperfusion after 4 hour ischemia, and Group V: 24 hour reperfusion after 4 hour ischemia. This study consisted of gross examination for flap survival and flow cytometry study of CD18 on neutrophils.

Results: The gross measurement of the flap showed different survival rate in group I(71%), II(68%), III(37%), IV(34%) and V(34%). All experimental groups showed an increase in the expression of CD18 compared to group O. The expression of CD18 was rapidly increased in ascending order in group I, II and III. But, the expression of CD18 was maintained in group IV and V.

Conclusion: The results can be implemented in the study to develop drugs which are capable of reducing

ischemia-reperfusion injury in microsurgical breast reconstruction.

Key Words: Ischemia-Reperfusion Injury, CD18, TRAM flap

1. 서 론

조직이 허혈 상태에 빠지게 되면 세포손상을 받게 되는데 재관류가 일어난 후 조직손상이 더욱 심화된다는 개념을 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury)이라 하고 정확한 발생기전에 대한 많은 연구들이 진행되어 왔다.^{1,2} 허혈-재관류 손상은 심근경색증과 뇌졸중 및 장기이식 등에서 관찰할 수 있으며, 간과 심장 등을 모델로 한 많은 연구들이 있었고 성형외과 영역에서는 사지 접합술과 피부관 등에서 관찰할 수 있어 재접합된 수지의 생존 및 피부관의 생존률 향상을 위해 관심이 집중되고 있다.^{3,6} 허혈 후 재관류 손상이 일어나면 산소 유리기, protease, interleukin-8, C5a, bacteria chemotatic factor 등의 혈관작용물질(vasoactive substance)이 유출되어 백혈구를 자극하여 활성화시키고 활성화된 백혈구가 혈관내피에 유착되어 여러 효소 및 산소 유리기 등을 유리시켜 혈관내피장벽을 파괴하고 혈관 밖으로 빠져나가 조직손상을 가져오게 된다.^{3,6} 백혈구와 혈관내피의 유착은 백혈구 표면의 결합자인 leukocyte adhesion receptor complex(CD11/CD18)와 혈관내피세포의 결합자인 intracellular adhesion molecule(ICAM)이 서로 반응하여 일어난다.^{4,5} 따라서 허혈-재관류 손상에서 백혈구와 혈관내피세포의 유착을 억제함으로써 손상을 줄일 수 있다.^{3,4} ICAM의 발현은 첫 8시간 동안 급격한 증가를 보이다가 그 이후 증가속도의 정도(slope)는 줄어들지만 지속적인 증가양상을 보이며, 이후 7일 까지도 증가하는 것으로 알려져 있다.^{1,2} 하지만 백혈구 표면의 결합자인 CD18 발현의 추세에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 저자들은 흰쥐의 복직근피부관 모델⁷을 이용한 허혈-재관류 손상에서 CD18의 시간대별 발현의 추세에 대해 알아보고, 이를 응용하여 횡복직근피부관술을 이용한 유방재건 등에서 피부관의 생존률을 증가시키기 위한 방법에 이용하고자 본 연구를 진행하였다.

Received April 7, 2006

Revised June 30, 2006

Address Correspondence: Sang Yub Yoon, M.D., Baram Clinic BBC, Gaonx Building 2F, 575 Shinsa-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-891, Korea. Tel: 02) 511-8758 / Fax: 02) 540-8759 / E-mail: ppsurgeon@korea.com

* 본 논문은 2003년 제 54차 대한성형외과학회 학술대회에서 구연 발표되었음.

II. 재료 및 방법

가. 연구재료

생후 8-9주된 체중 300-400 gm의 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐의 복직근피부피판을 거상한 후, 허혈성 조작을 가하지 않고 다시 봉합한 대조군과 피판을 일으킨 후 혈관검자를 사용하여 4시간 동안 허혈성 조작을 가한 실험군으로 나누었다. 각 실험군은 피판을 일으키고 허혈성 조작을 가한 다음 2시간(group I), 4시간(group II), 8시간(group III), 12시간(group IV), 24시간(group V)에 희생시켜 CD18의 발현 정도를 검사하였다. 각 군별로 10마리씩 모두 60마리의 흰쥐를 사용하였다. 통계처리는 Wilcoxon의 순위합 검정법(Wilcoxon rank sum test)을 이용하였다.

나. 연구방법

1) 피판 거상 및 처치

흰쥐를 5% Ketamine hydrochloride(Ketalar[®], Yuhan corporation, Seoul) 80 mg/kg로 근육 주사하여 마취시킨

후, 흉복부 및 서혜부의 털을 완전히 제거한 다음, 10% Povidone iodine 용액으로 소독하였다. 복부 상부에 하나의 상 상복부 혈관(superior epigastric vessel)을 피판경으로 삼고 5.0 × 5.0 cm 크기의 복직근피부피판을 작도하되 상부경계는 검상돌기에 위치하고 외측 경계는 전액와선(anterior axillary line)의 연장선에 놓이게 하였다(Fig. 1, Above, left). 피판연을 따라 피부와 복직근 근층까지 절개를 가하고 외측에서 내측으로 복직근을 포함하여 복막 상부층을 따라 피판을 바리 거상하였다(Fig. 1, Above, right). 복직근의 하부에서는 하 상복부 혈관(inferior epigastric vessel)을 찾아 결찰하여 복직근피부피판은 단지 하나의 상 상복부 혈관(superior epigastric vessel)에서만 혈류를 공급받는 피판이 되도록 하였다. 혈관검자(vessel clamp)를 사용하여 4시간 동안 허혈 손상을 주었다(Fig. 1, Below, left). 복직근 거상 후 남은 복막은 매우 약하여 양쪽의 외사근(external oblique muscle)을 중앙부로 끌어당겨 복막을 강화시켰다. 복직근피부피판에 허혈성 손상을 준 후 4시간째 혈관 검자를 풀어 재관류 시켰으며 피판은 흰쥐의 복부에 다시 봉합하였다(Fig. 1, Below, right). 각 군별로

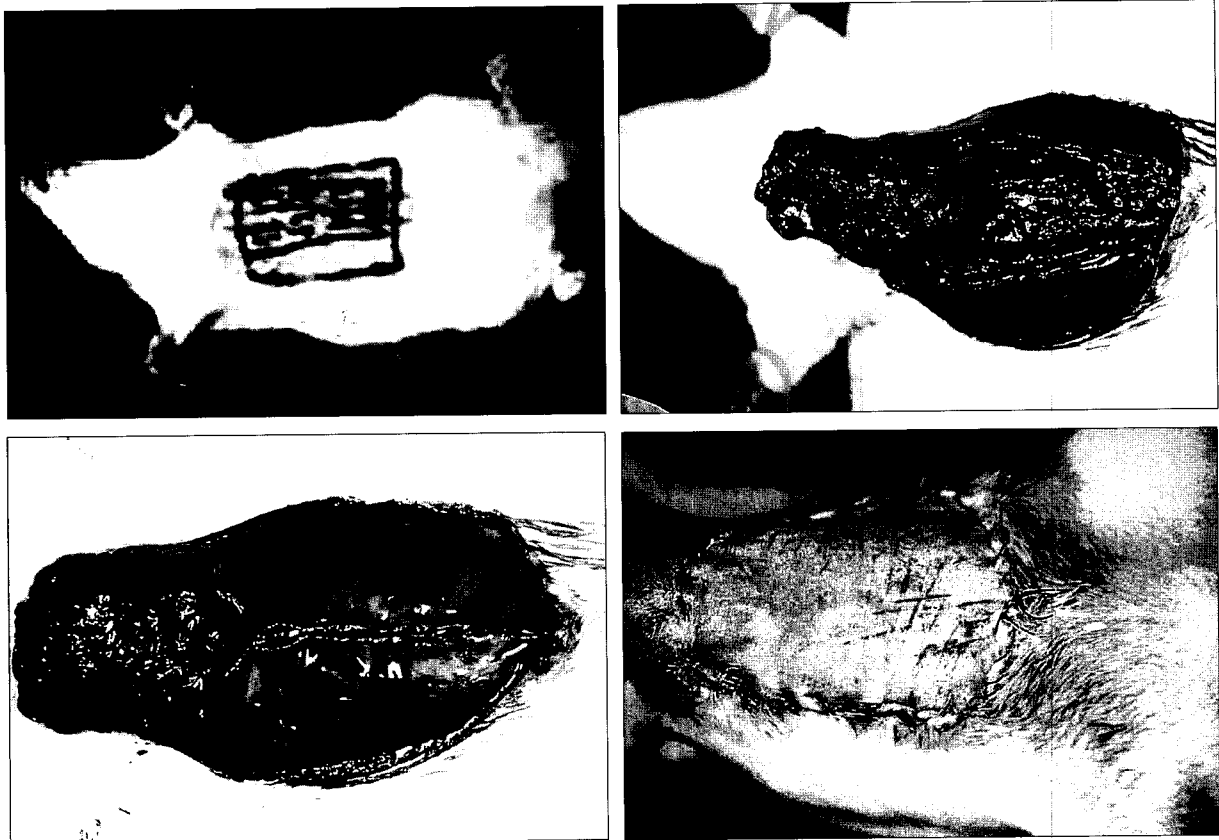


Fig. 1. The views show operative steps about the elevation of flap and the ischemia-reperfusion injury. (Above, left) The rectus abdominis musculocutaneous flap(5 × 5 cm) design was drawn on the abdomen of rat. (Above, right) The pedicled TRAM flap was elevated with the double vascular pedicle. (Below, left) We made the ischemic injury by clamping of superior epigastric vessel for 4 hours. (Below, right) Flap was closed in situ after removal of clamping.

허혈-재관류 손상 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 후 심장 천자를 통해 흰쥐의 혈액을 얻어 CD18 단클론 항체 및 Flow cytometry를 사용하여 CD18의 발현을 관찰하였다.

2) 피판 생존률

각 군 피판의 생존률은 육안으로 관찰했는데 피판의 색깔로 생존영역을 파악했다. 생존한 피판의 면적을 투명종이로 옮겨 그린 후 모눈종이에 한번 더 옮겨 피판의 생존 면적을 측정하여 처음 작도한 피판의 면적에 대한 백분율로 계산하였다.

3) CD18의 발현 측정

심장 천자를 통해 얻은 혈액을 헤파린 관(EDTA tube)에 넣어 보관 및 이동한 후, Ficoll-Paque lymphocyte separation medium에 혈액을 넣었다. 30분 동안 1800 rpm(4°C)으로 원심분리 하였다. 상층부와 중간층 사이에 있는 림프구를 조심스럽게 추출해내었고, 추가적으로 phosphate buffered saline(PBS) 10 cc 넣어 씻어낸 후, 1800 rpm(4°C)으로 10분 동안 원심분리 하였다. 하층부만 남기고 상층부의 부유액은 버렸다. PBS 1 cc를 더 넣은 후 FACS용관 2개에 0.5 cc씩 나누었다. 한쪽 관에만 FITC라는 형광물질이 부착된 항백서(anti-mouse) CD18 항체 20 µl를 넣었다. 4°C에서 30분 동안 배양하였다. PBS 2 cc 넣은 후 1800 rpm으로 5분(4°C) 더 원심분리 한 후 상층부 부유액은 버렸다. PBS 200 µl를 넣고 잘 섞은 후 결과를 계측하였다.

III 결 과

피판의 생존률에 대한 육안검사 결과 1군은 64%에서 75%까지 평균 70.7%(± 3.6)의 생존률을 보였고 2군은 65%에서 71%로 평균 68.2%(± 2.1)의 생존률을 보였다. 3군과 4군 및 5군의 피판 생존률의 평균치 및 표준편차는 36.8% ± 5.1, 33.9% ± 5.6, 33.7% ± 5.1로 범위는 25%에서 46%까지 였다. Wilcoxon의 순위합 검정법상 1군과 2군 사이에는 유의한 차이가 없었으며, 3군과 4군 및 5군 사이에도 유의한 차이는 없었으나 1, 2군을 하나로 묶고 3, 4, 5군을 하나로 묶을 때 3, 4, 5군의 결과가 1, 2군의 경우에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 연구의 초기 단계에서 피판 생존률이 각 군 평균치를 두 배 이상(200%) 넘거나 평균치보다 50% 이상 작은 경우는 결과 해석에 혼동을 줄 수 있는 잘못된 개체로 판단하고 제외시켰다.

Flow cytometry를 이용한 CD18의 발현 검사는 허혈-재관류 손상 이후 2시간, 4시간, 8시간으로 갈수록 증가하는 양상을 보이다가 12시간과 24시간에서 결과가 일정하게 유지되었다(Fig. 2). 각 실험군의 평균치를 비교하여 그래

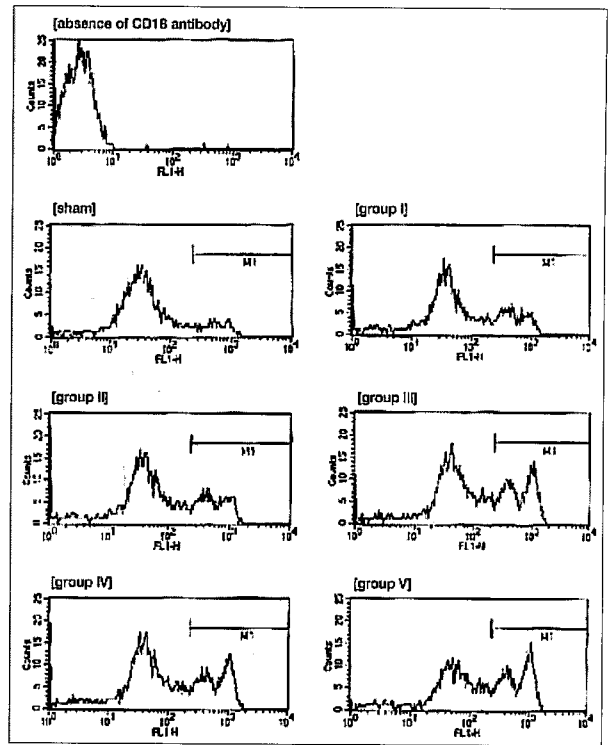


Fig. 2. The expression of CD18 on neutrophils after 4 hours of ischemia and reperfusion was shown. Peripheral blood samples were stained using TIFC-labeled anti-mouse CD18 antibody as well as a FITC-labeled isotype-matched control antibody. In each samples, the cells were counted and gated for neutrophils based on forward and side scatter characteristics. The group I, II, III, IV and V demonstrated clear cut increase of CD18 expression compared to the sham group.

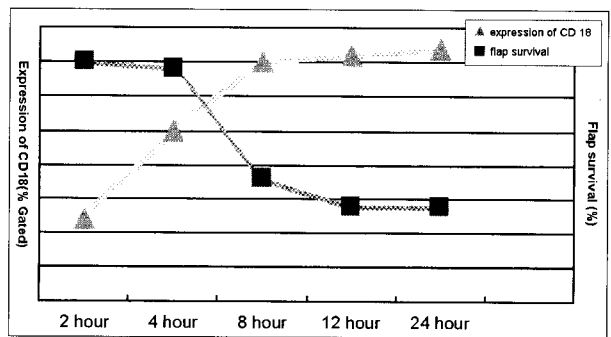


Fig. 3. The linear expression of CD18 and survival flap dimensions according to times.

프로 나타냈을 때 피판의 생존률과 CD18의 발현 정도 사이에 반비례 관계가 성립함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

IV 고 찰

형복직근피판술을 이용한 유방재건술에서 혈류공급을 증가시키기 위한 여러 수술방법이 개발되어 시행되고 있

다.^{8,9} 외과적 지연처치는 피판 수술 전 혈관에 대해 조작을 가하는 것으로 혈류공급을 증가시켜 과거 임의형 피부피판술(random pattern skin flap)에서 생존 면적을 증가시키기 위해 사용되었고 근피판이나 근피부피판술에서도 많이 시행되고 있다.¹⁰ 피판술 후 약물을 이용하여 혈류공급을 증진시키기 위한 시도는, 그 결과들이 상반되고 혼란스러워 임상에서 활발히 이용되고 있지는 못하다.¹¹ 황복직 근피판술의 경우 외과적 지연처치로 피판 생존이 증가될 수 있다는 사실은 동물실험이나 임상수술에서 증명된 바 있지만,¹² 가장 효과적인 방법이나 정확한 기간에 대한 확실한 결론이 없으며, 수술을 한 번 더 해야 한다는 단점 때문에 보다 쉽게 피판자연 효과를 얻을 수 있는 약물에 대한 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구는 피판 생존률 증가를 위한 약제 개발의 기초연구로서 디자인되었다.

흰쥐의 복직근피부피판 모델은 해부학적 구조나 혈관경 사이의 우위성 및 혈류학적 양상이 인간과 매우 유사하다고 보고되었는데, 인간과의 차이점은 흰쥐에서는 복직근의 우위 혈관(dominant pedicle)이 하 상배벽 혈관(inferior epigastric vessel)이 아니라 상 상배벽 혈관(superior epigastric vessel)이다.¹³ 따라서 본 저자들은 상 상배벽 혈관을 피판경으로 하는 복직근피부피판을 거상하여 연구를 진행하였다. 허혈-재관류 손상에서 백혈구와 혈관 내피의 유착이 중요한 단계인데, 백혈구 표면의 결합자(ligand)인 CD11/CD18와 혈관내피세포의 결합자인 ICAM이 서로 결합하여 혈관내피세포를 활성화한다. 또한 활성화된 혈관내피세포가 조직손상을 심화시킨다고 알려져 있다.^{4,5} 따라서 허혈-재관류 손상에서 백혈구와 혈관내피세포의 유착을 억제함으로써 피판손상을 줄일 수 있게 된다.^{3,4} 혈관내피세포의 결합자인 ICAM의 발현은 첫 8시간 동안 급격한 증가를 보이다가 이후 증가 속도는 줄어들지만 지속적인 증가양상을 보이며, 이후 7일 까지도 증가양상을 보이는 것으로 보고되었다.^{12,14} 강력한 말초 혈관 확장제이며 혈소판 응집억제제로 알려진 프로스타글란딘 E1(PGE1)은 피판의 생존률을 높이는 효과가 있는 것으로 보고된 바가 있는데, 이는 면역조직학 연구를 통해 알아본 바 PGE1에 의해 ICAM의 발현이 하향조절(down regulation)되어 피판의 생존률이 나아짐을 알 수 있었다.¹⁵ 따라서 CD18의 발현을 하향조절 할 수 있는 약제가 개발되면 프로스타글란딘처럼 피판의 생존률을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이런 약제 개발을 위해서는 ICAM의 경우처럼 허혈-재관류 손상이 발생하는 초기 시간대의 CD18 발현의 추이를 아는 것이 중요하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 CD18의 발현 양상이 이미 알려진 ICAM의 발현 양상과 초기 24시간 동안 비슷함을 확인할 수 있었고, 초기 24시간 동안의 약제사용이 실제 임상에서 만나게

되는 허혈-재관류 손상에서 피판의 생존률에 의미가 있을 것으로 판단된다.

이전의 CD18의 단일클론항체(monoclonal antibody) 투여 연구⁶에서는 허혈 손상을 일으키고 난 후, 재관류 직전에 항체를 투여하고 그 효과를 지켜보는 방법을 적용하였다. 그러나 이러한 방식은 실제 임상에 적용하기에 무리가 있다. 즉, 허혈-재관류 손상이 일어날 경우를 미리 예측하여 허혈-재관류 손상 전에 약물을 투여하기가 현실적으로 어렵다는 것이다. 실제 임상에서는 피판 생존에 심각한 위험 징후가 포착될 때 약제를 사용하고 미리 예방목적으로 100% 사용하지 않는다. 어느 정도 허혈-재관류 손상이 진행되고 난 다음에야 약제를 사용하게 된다는 것이다. 따라서 본 연구처럼 CD18의 발현 양상자체를 연구하는 논문이 선행되어야 한다고 본다. 또한 약제의 효과가 언제까지 지속 될 것인가? 반감기는 어느 정도가 될 것인가? 등의 문제에 대한 추가 연구가 있어야 한다. CD18 발현 양상을 아는 것은 적절한 반감기를 가지는 항체 및 약제 개발의 근간이 된다고 할 수 있다. 본 연구는 재현성이 높은 디자인으로 반복적인 실험과 비슷한 디자인의 연구를 계속하여 자료를 확인하는 작업이 뒤따라야 될 것으로 생각되며 더 나아가 허혈-재관류 손상 후 시간대별 약제사용의 연구가 뒤따라야 한다.

V. 결 론

네 시간의 허혈조작을 가한 후 재관류 시킨 흰쥐의 복직근피부피판에서 CD18의 발현을 Flow cytometry로 확인한 결과 2시간, 4시간, 8시간으로 갈수록 증가하는 양상을 보였으며, 12시간과 24시간 후에는 8시간에 비해 비슷한 수준으로 유지되었다. 또한 CD18의 발현 양상과 피판 생존률은 반비례 관계가 있음을 알 수가 있었고, 이는 피판 생존률을 증가시키기 위한 약제 연구의 기초자료로서 가치가 있다고 판단된다.

REFERENCES

- McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159, 1985
- Kang NH, Kim SO, Kim JD, Yang SY, Ahn ST: The effect of CD18 monoclonal antibody on tissue and serum interleukin-8 concentration in reperfusion injury. *J Korean Soc Plast Surg* 26: 252, 1999
- Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, Harlan JM, Rice CL: Role of neutrophil in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery* 106: 509, 1989
- Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM: Inhibition of leukocyte adherence by

- anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2643, 1990
5. Harlan JM, Vedder NB, Winn RK, Rice CL: Mechanisms and consequences of leukocyte-endothelial interaction. *West J Med* 155: 365, 1991
 6. Han KT, Choi WS, Kang NH: Effect of CD18 monoclonal antibody on the rat island skin flap survival after various ischemic times. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 25: 1258, 1998
 7. Dunn RM, Huff W, Mancoll J: The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg* 31: 352, 1993
 8. Wagner DS, Michelow BJ, Hartrampf CR Jr: Double-pedicle TRAM flap for unilateral breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 88: 987, 1991
 9. Hallock GG, Altobelli JA: Assessment of TRAM flap perfusion using laser doppler flowmetry: an adjunct to microvascular augmentation. *Ann Plast Surg* 29: 122, 1992
 10. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG: An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 89: 408, 1992
 11. Pang CY, Forrest CR, Morris SF: Pharmacological augmentation of skin flap viability: a hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. *Ann Plast Surg* 22: 293, 1989
 12. Restifo RJ, Ahmed SS, Isenberg JS, Thomson JG: Timing, magnitude, and utility of surgical delay in the TRAM flap: I. Animal studies. *Plast Reconstr Surg* 99: 1211, 1997
 13. Ozgenta? 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
 14. 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
 15. Hong JP, Chung YK, Chung SH: The effect of prostaglandin E1 versus ischemia-reperfusion injury of musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg* 47: 316, 2001