

## Relaxin을 분비하는 아데노바이러스가 피판의 생존에 미치는 영향

윤인식<sup>1</sup> · 박용순<sup>1</sup> · 전영우<sup>1</sup> · 전여름<sup>1</sup> · 이원재<sup>1</sup> · 윤채옥<sup>2</sup> · 나동균<sup>1</sup>

연세대학교 의과대학 성형외과학교실 인체조직복원연구소<sup>1</sup>, 연세암연구소<sup>2</sup>

### Effect of Relaxin Expressing Adenovirus for Rat Skin Flap Viability

In Sik Yun, M.D.<sup>1</sup>, Yong Sun Park, M.D.<sup>1</sup>,  
Young Woo Cheon, M.D.<sup>1</sup>, Yeo Reum Jeon, M.D.<sup>1</sup>,  
Won Jai Lee, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Chae Ok Yun, Ph.D.<sup>2</sup>,  
Dong Kyun Rha, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Human Tissue Restoration & Department of Plastic & Reconstructive Surgery, <sup>2</sup>Yonsei Cancer Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Of various effects of relaxin, we assumed that anti-fibrotic effects, neovascularization effects and vasodilatation effects of relaxin might enhance the survival rate of skin flap. In the current study, we used adenovirus expressing relaxin genes to examine whether these genes could enhance the survival rate of a skin flap.

**Methods:** A total of 30 Sprague-Dawley rats were divided into three groups: RLX group (10; relaxin virus injected group), CTR group (10; no gene coded virus injection group), and PBS group (10; PBS injected group). Each group was intradermally injected with the virus ( $10^7$  PFU) and PBS 48 hours before and immediately before the flap elevation. A distally based flap 3 × 9 cm in size was elevated on the dorsal aspect of each rat. Following this, a flap was placed in the original location and then sutured using a #4-0 Nylon. A surviving area of the flap was measured and then compared on postoperative days 3, 7 and 10. Using a laser Doppler, the amount of blood flow was measured. On postoperative day 10, tissues were harvested for histologic examination and the number of blood vessels was counted.

**Results:** There was a significant increase in the area of the flap survival in the RLX group on postoperative days 3 and 7. The Doppler measurement also showed significantly

increased blood flow immediately after the operation and on postoperative days 7 and 10. The number of blood vessels was significantly greater in the RLX group in the tissue harvested on postoperative day 10. The VEGF concentration was significantly higher in the RLX group than others in the tissues harvested on postoperative day 10.

**Conclusion:** Following an analysis of the effects of relaxin-secreting adenovirus on the survival of a flap, the surviving area of the flap and the blood flow also increased. A histopathology also showed an increase in the number of blood vessels and the concentration of VEGF.

**Key Words:** Relaxin, Adenovirus, Gene therapy, Angiogenesis, Flap

## I. 서 론

악성종양 절제술, 외상, 선천성 기형 등으로 인한 연부 조직의 부족이나 결손 등을 재건하기 위해서 피판이 효율적이며 최근 각종 피판술의 빈도 및 적응증이 증가하고 있다. 적절한 피판술을 통해 환자는 기능적 외형적 회복 후 일상생활로 복귀를 기대할 수 있으나 수술이 실패할 경우 창상치유의 장애 및 두경부 재건의 경우 심각한 합병증 등을 초래할 수 있으며, 환자의 경제적, 시간적 손실을 겪게 된다. 피판술 실패의 대표적 원인으로는 허혈성 괴사, 감염, 혈종 등이 있으며 이 중 혈액순환의 장애로 괴사가 일어나는 경우가 제일 흔하며 이러한 허혈성 괴사를 줄이거나 막기 위해 많은 노력들이 있어 왔다.

Relaxin (RLX)은 insulin-like growth factor (IGF) 부류에 속하는 6 kDa의 폴리펩타이드 호르몬 (polypeptide hormones)으로 주로 황체 (corpus luteum)와 자궁내막 (endometrium)에서 만들어지며 임신기간 동안에 혈장 농도가 증가한다. 최근 연구결과에 의하면 Relaxin은 생식 기관외 다른 조직에서도 다양한 생물학적 활성을 나타내다고 보고되어 master hormone으로 분류되고 있다. 특히 Relaxin의 항섬유화 작용 (anti-fibrosis effect) 및 창상치유에 관여하는 작용과 혈관확장에 의한 심근 보호 기능에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며, 혈관신생 효과도 보고되어 있다.<sup>1-3</sup>

Received May 7, 2010

Revised June 14, 2010

Accepted July 19, 2010

**Address Correspondence:** Dong Kyun Rha, M.D., Ph.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, 250 Seongsanno, Sodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. Tel: (02) 2228-2216/Fax: (02) 393-6947/E-mail: dkrah@yuhs.ac

\* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2008년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음 (과제번호: 6-2008-0138).

피판거상 직후 국소피판의 근위부는 교감신경의 절단과 catecholamine 방출로 인한 혈관 수축, 손상에 대한 국소 반응 등의 영향으로 혈류가 감소하게 되며 이에 따라 원위부는 동정맥 선트의 형성 및 혈압은 감소하게 되며 이러한 상황이 어느 한계를 넘어 지속되게 되면 원위부부터 피판의 괴사가 일어나게 된다.

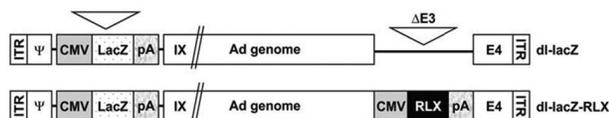
원위부 피판의 괴사의 가장 큰 원인인 혈행장애 (Inadequate perfusion)를 Relaxin의 혈관확장, 혈관신생 효과와 이로 인한 혈행증가로 허혈 피판의 괴사를 극복 시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 Relaxin 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 이용하여 이를 국소피판거상 시 투여하여 피판의 생존율을 얼마나 증대시킬 수 있는지를 확인해보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

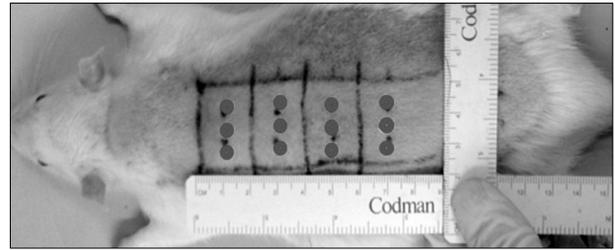
### 가. 실험동물 및 Relaxin 발현하는 아데노바이러스의 준비

수컷 Sprague-Dawley rats (weighing 300~400 g) 30마리를 대상으로 하였다. 이들을 10마리씩 세 군으로 나누는데, 제 1군(10마리)은 Relaxin 발현 아데노바이러스 투여군(RLX 군)이며, 제 2군(10마리)은 Relaxin을 발현하지 않는 아데노바이러스 투여군(CTL 군)으로 하였으며, 제 3군(10마리)은 phosphate buffered saline (PBS)만을 투여한 실험군(PBS 군)으로 하였다. 이들은 동일한 조건에서 각각 빛과 온도가 조절되는 공간에서 사육하였다.

Relaxin을 발현하는 아데노바이러스는 연세의대 암연구소에서 기존에 제작하였던 방법으로 제작하여 실험에 사용하였다 (Fig. 1).<sup>4</sup> 실험동물의 등에 3×9 cm의 꼬리쪽을 기저부로 하는 임의 피판을 디자인하고, 피판 수술 48시간 전에 제 1군(RLX 군)과 제 2군(CTR 군)에는 각각 1×10<sup>7</sup> PFU의 Relaxin을 발현하는 아데노바이러스 (dl-LacZ-RLX)



**Fig. 1.** Schematic representations of the adenoviral vectors. The dl-lacZ has the whole E1 region deleted and expresses the reporter gene lacZ ( $\beta$ -galactosidase protein) under the control of the constitutive cytomegalovirus (CMV) promoter inserted into the E1 region. The replication-incompetent relaxin-expressing adenovirus, dl-lacZ-RLX, carries a relaxin gene driven by the CMV promoter that was inserted into the E3 region.  $\Delta$  E3 denotes the deletion of E3 gene. ITR=inverted terminal repeat;  $\Psi$ =packaging signal; pA=polyA sequence; IX=protein IX; and RLX=relaxin.



**Fig. 2.** The design of flap and location of virus injection. The flap was designed on the back of rat sized 3×9 cm. Virus injection was performed on 12 sites in the flap.

와 Relaxin을 발현하지 않는 아데노바이러스 (dl-LacZ)를 PBS 1.2 mL에 희석하여 0.1 mL씩 피판거상 부위 내 12곳에 일정한 간격을 두고 피내주입 (intradermal injection)하였다. PBS 그룹에는 동량의 PBS를 같은 방법으로 투여하였다 (Fig. 2).

### 나. 피판 수술 및 바이러스의 주입

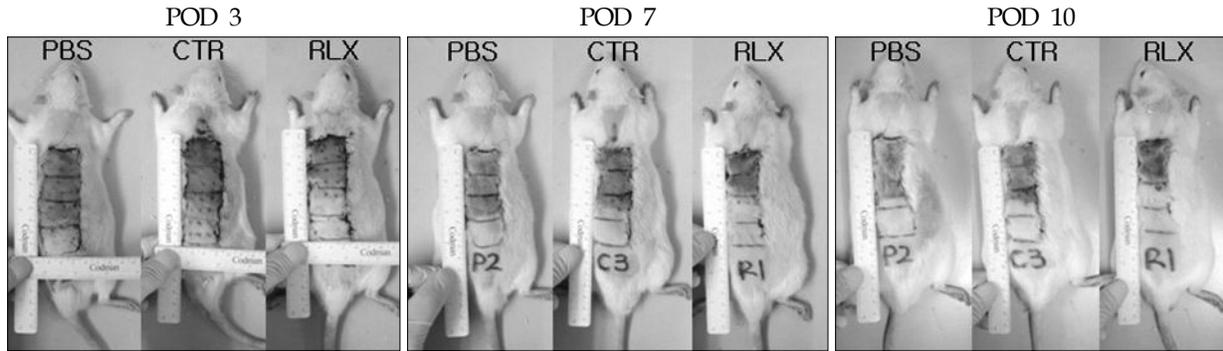
바이러스 전처치 48시간 후 isoflurane (Aerane<sup>®</sup>; Ilung Pharmaceuticlas, Seoul, Korea)을 이용한 흡입마취와 30 mg/kg zolazepam-tiletamine mixture (Zoletil<sup>®</sup>; Virbac, Carros, France)와 10 mg/kg Xylazine (Rompun<sup>®</sup>; Bayer, Seoul, Korea)의 복강 내 주입으로 실험동물의 마취를 유도하였다. 각 그룹별로 바이러스와 PBS를 전처치와 동일한 방법으로 피판거상 부위에 다시 한번 주입한 후 미리 디자인한 대로 3×9 cm의 피판을 거상하였다. 이후 같은 크기의 실리콘 시트를 피판과 근육층 사이에 위치시킨 후 다시 피판을 원위치에 놓고 #4-0 Nylon으로 봉합하였다.

### 다. 피판의 생존 면적 및 혈류량 측정

피판의 생존 면적은 수술 후 3, 7, 10일에 배부의 디지털 이미지를 찍어, 전체 피판 면적 중 피판의 생존 면적을 비율로 산출하여 비교하였다. 피판의 혈류량은 Laser Doppler (Periflux<sup>®</sup> system 5000, Perimed AB, Jarfalla, Sweden)를 이용하여 전처치 전, 수술 직후, 수술 9시간 후 및 수술 후 3일, 7일, 10일 후에 측정하였다. 피판의 근위부와 원위부의 혈류량을 각각 측정하여 그룹 간 비교를 시행하였다.

### 라. 조직 내 혈관의 수 및 혈관내피증식인자(VEGF)의 농도 측정

수술 후 10일에 1×1 cm의 조직을 피판의 생존 부위 중 가장 원위부 중앙에서 채취하였다. 조직은 포르말린으로 고정하여 파라핀 블록으로 제작되었다. 각 section은 5  $\mu$ m로 폭으로 얻어서 H&E 염색과 VEGF 면역조직화학염색 (immunohistochemistry)을 시행하였다. H & E 염색 슬라



**Fig. 3.** Comparison of survival area. The survival area of flap in RLX group is larger than other groups in the course of time.

이드를 250배 광학현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하여 단층으로 혈관 내피세포들이 분포되어 있으면서 평활근 층 (smooth muscle layer)이 없는 것을 모세혈관으로 판단하여 그 개수를 그룹별로 비교하였다. 각각의 슬라이드에서 8곳, 각각은 0.46 mm<sup>2</sup>의 면적을 임의로 정하여 모세혈관의 개수를 측정하였다.<sup>5</sup> VEGF 면역조직화학염색 슬라이드는 MetaMorph<sup>®</sup> (Universal Image Corp.) 이미지 분석 프로그램을 통해 VEGF 발현량을 반정량적으로 분석하였다.

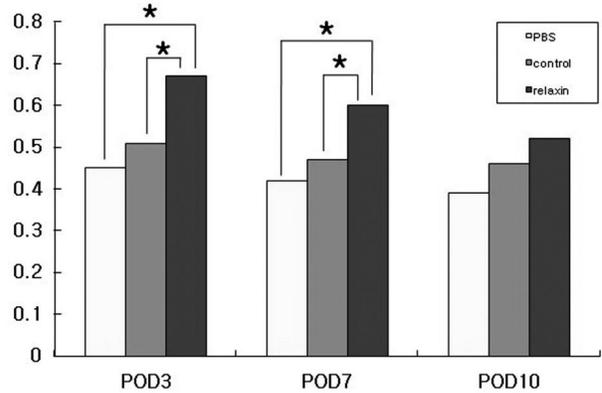
### III. 결 과

#### 가. 피판의 생존 면적

수술 후 3일째 촬영한 디지털 이미지에서 제 1군 (RLX 군, 실험군)의 생존 면적은 전체 피판 면적의 67%, 제 2군 (CTR 군)은 51%, 제 3군 (PBS 군)은 45%로 relaxin을 발현하는 아데노바이러스를 처치한 실험군 피판 생존 면적이 통계적으로 유의하게 넓은 것으로 나타났다 (*p* value: RLX vs. CTR *p*=0.024, RLX vs. PBS *p*=0.020, CTR vs. PBS *p*=0.423). 수술 후 7일째의 피판 생존 면적은 제 1군이 60%, 제 2군이 47%, 제 3군이 42%로 역시 실험군에서 통계적으로 유의하게 피판의 생존 면적이 증가하였다 (*p* value: RLX vs. CTR *p*=0.026, RLX vs. PBS *p*=0.027, CTR vs. PBS *p*=0.201). 수술 후 10일째에는 피판의 생존 면적이 제 1군에서는 52%, 제 2군에서는 46%, 제 3군에서는 39%로 제 1 실험군에서 높게 나타나기는 하였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다 (*p* value: RLX vs. CTR *p*=0.113, RLX vs. PBS *p*=0.056, CTR vs. PBS *p*=0.287) (Fig. 3, 4).

#### 나. 피판 혈류량 측정

Laser Doppler를 이용한 혈류 측정 결과, 피판의 근위부에서는 수술 직후, 수술 후 7일과 10일째에 제 1군 (RLX 군)에서 제 2군 (CTR 군)과 제 3군 (PBS 군)보다 통계적으로

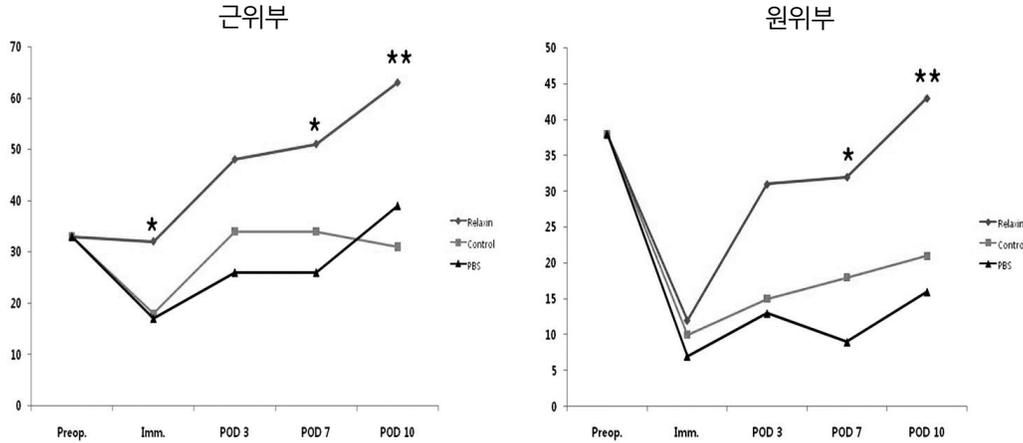


**Fig. 4.** The survival rate of flap. The survival rate of flap in RLX group is significantly larger than other groups on postoperative day 3 and 7 (\*: Significant difference, *p* < 0.05).

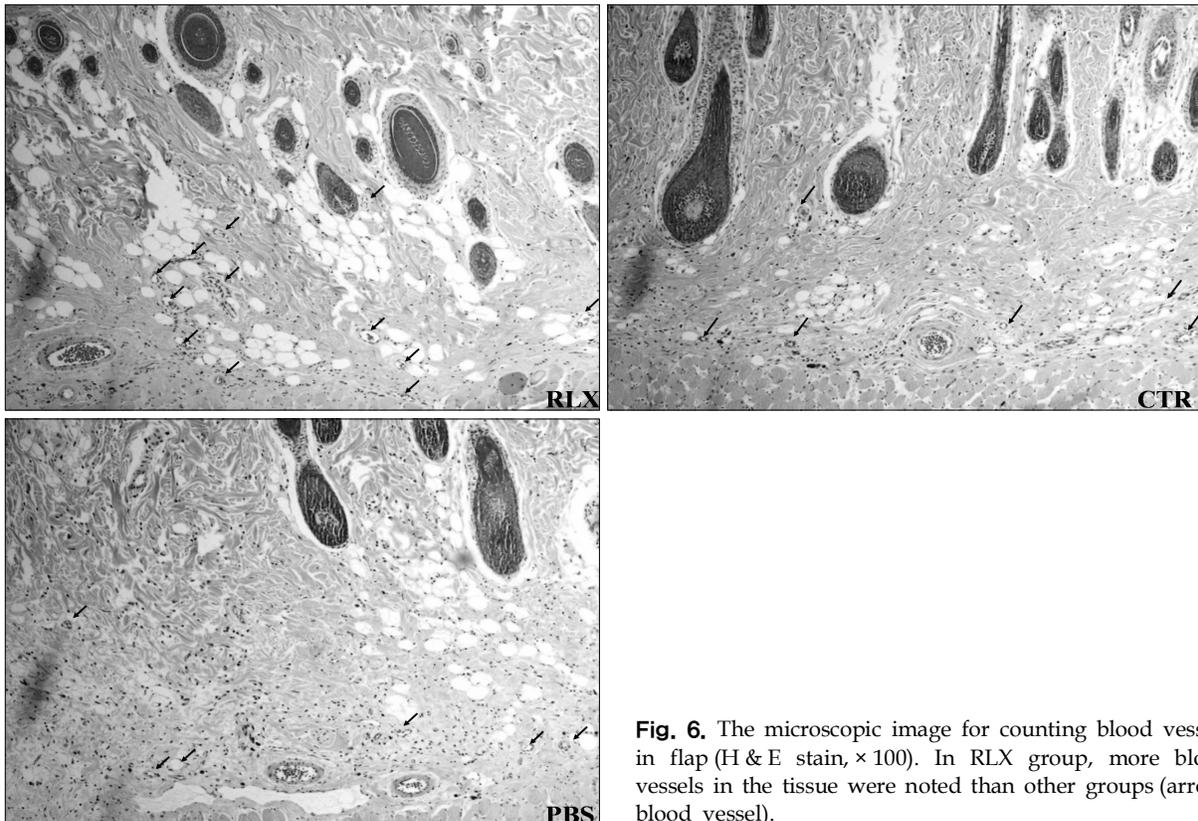
유의하게 혈류가 증가된 소견을 보였다 (*p* value: 수술 직후 *p*=0.042, 수술 후 7일 *p*=0.028, 수술 후 10일 *p*=0.0073). 피판의 원위부에서는 수술 후 7일 째와 10일 째에 제 1군 (RLX 군)에서 제 2군 및 3군 보다 통계적으로 유의하게 혈류가 증가된 것으로 나타났다 (*p* value: 수술 후 7일 *p*=0.032, 수술 후 10일 *p*=0.0065), (Fig. 5).

#### 다. 조직 내 혈관 개수 비교

수술 후 10일째에 채취한 조직에서 각 그룹별로 혈관의 개수를 세어 비교한 결과, 제 1군 (RLX 군)에서는 0.46 mm<sup>2</sup>의 면적 당 평균 7.60개 (±1.68), 제 2군 (CTR 군)에서는 평균 6.33개 (±1.32), 제 3군 (PBS 군)에서는 평균 6.11개 (±1.94)로 relaxin을 발현하는 아데노바이러스를 처치한 실험군에서 혈관의 개수가 높게 나타났다. 혈관 개수의 비교에서 제 1군과 제 2, 3군 간의 차이는 통계적으로 유의한 결과로 나타났다 (*p* value: RLX vs. CTR *p*=0.0026, RLX vs. PBS *p*=0.0056, CTR vs. PBS *p*=0.6504) (Fig. 6, 7).



**Fig. 5.** The result of blood flow measuring. In proximal part of the flap, the blood flow of RLX group was significantly increased at immediate postoperation and on postoperative day 7 and 10. In distal part of the flap, blood flow of RLX group was significantly increased than other groups on postoperative day 7 and 10 (\*: Significant difference,  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).



**Fig. 6.** The microscopic image for counting blood vessels in flap (H & E stain,  $\times 100$ ). In RLX group, more blood vessels in the tissue were noted than other groups (arrow: blood vessel).

**라. VEGF 면역조직화학염색 결과**

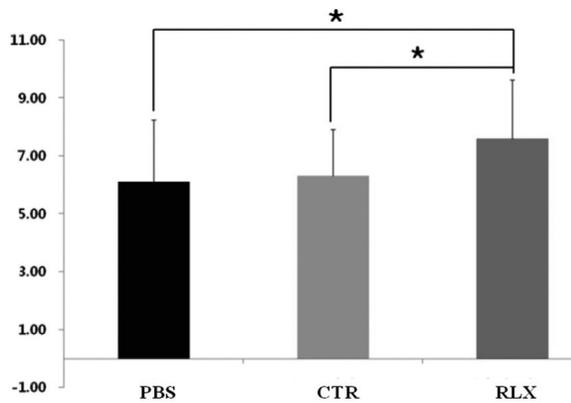
수술 후 10일째 채취한 조직을 VEGF 면역조직화학염색 하여 MetaMorph® 이미지 분석 프로그램으로 정량 분석한 결과, 제 1군에서 VEGF의 발현량이 통계적으로 유의하게 증가되어 있었다 ( $p$  value: RLX vs. CTR  $p < 0.001$ , RLX vs. PBS  $p = 0.001$ , CTR vs. PBS  $p = 0.126$ ) (Fig. 8, 9).

**IV. 고 찰**

피판거상 직후 국소피판의 근위부는 교감신경의 절단과 카테콜라민 (catecholamine) 방출로 인한 혈관 수축, 손상에 대한 국소 반응 등의 영향으로 혈류가 감소하게 된다. 이에 따라 피판의 원위부에서는 동정맥 단락 (shunt)이 형성되고 혈압은 감소하게 되며, 이러한 상황이 어느 한계를 넘어 지

속되게 되면 원위부에서부터 피판의 괴사가 일어나게 된다.<sup>6</sup> 이러한 괴사를 막기 위한 예방적 방법으로 지연술 (delay procedure)을 사용하거나 adenosine, monophosphoryl lipid A 등의 투여가 시도된 바 있으며 그 효과도 어느 정도 입증된 바 있다.<sup>7-8</sup>

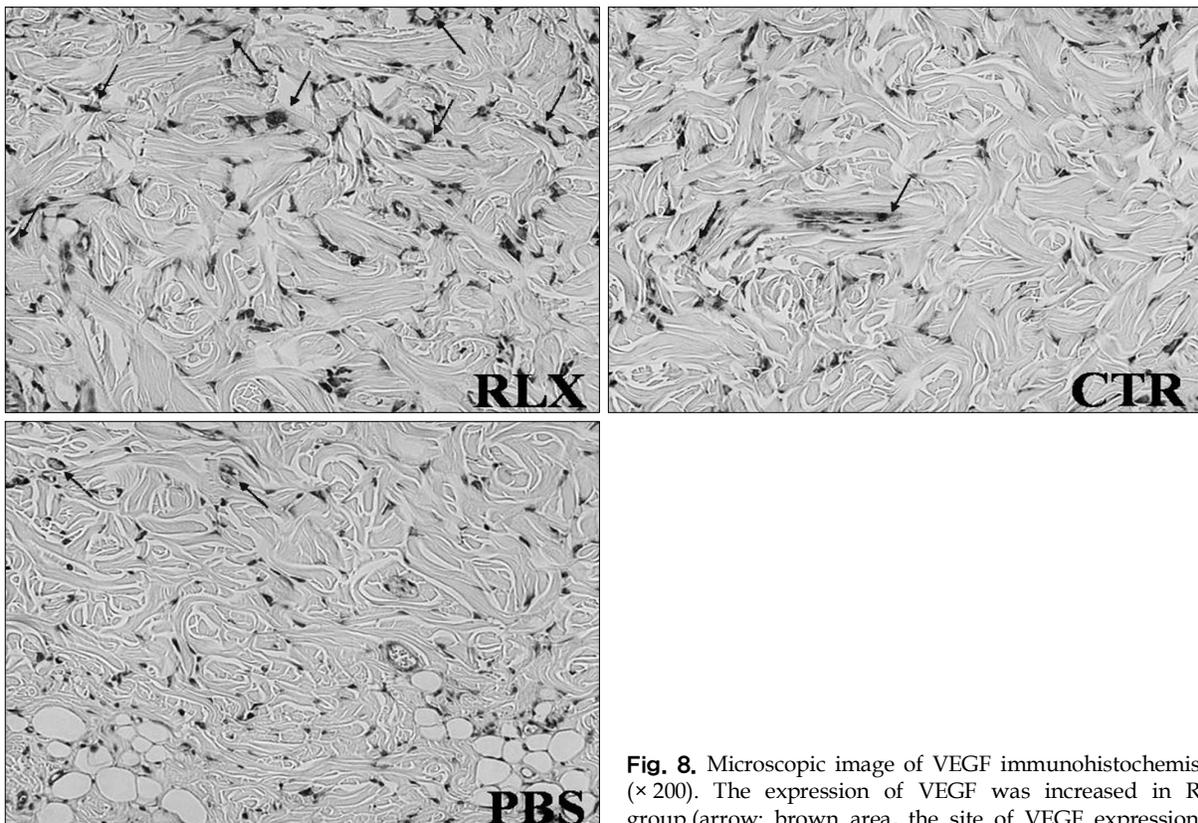
이러한 시도 중 최근의 것으로 VEGF의 투여를 들 수 있



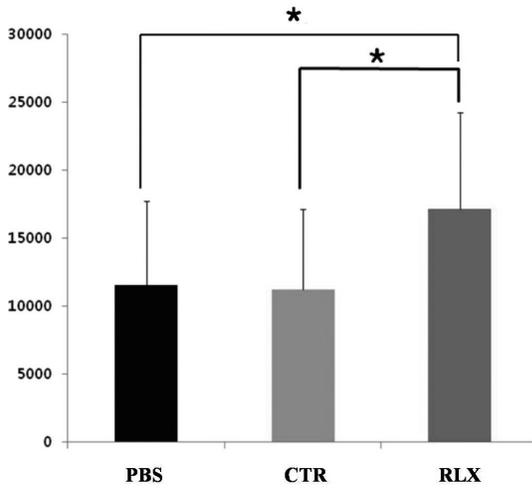
**Fig. 7.** The comparison of vessel count. The mean blood vessel count of RLX group was 7.60 (± 1.68) by area, 6.33 (± 1.32) of CTR group, 6.11 (± 1.94) of PBS group. RLX group showed more blood vessels than other groups (\*: Significant difference,  $p < 0.05$ ).

다. Seify 등<sup>9</sup>과 Scalise 등<sup>10</sup>은 피판술 7일 전에 VEGF-165를 진피 내 또는 피판 내 동맥에 주입함으로써 피판의 생존을 증대시킬 수 있었다는 보고를 한 바 있다. 하지만 VEGF-165의 생물학적 반감기는 일반적인 조건에서 30~45분에 불과하며 저산소증 상태에서는 6~8시간 정도로 알려져 있어 피판의 생존율을 극대화시키기에는 한계가 있었다.<sup>11</sup> 이러한 한계를 극복하기 위하여 Huang 등은 VEGF-165를 발현하는 유전자를 포함하는 아데노바이러스 (Ad.VEGF-165)를 피판 수술 7일 전 피판의 진피 내에 주입한 후 임의 국소피판을 거상하여 피판의 생존율을 유의하게 증가시킬 수 있었다는 보고를 한 바 있다.<sup>12</sup>

이 같은 바이러스를 이용한 유전자 치료는 본래 항종양 효과를 위해서 주로 연구되어져 왔다.<sup>4</sup> 아데노바이러스 (Adenovirus, Ad)의 복제에 필수적인 E1 유전자 대신에 치료용 유전자 (본 연구의 경우는 Relaxin)를 삽입한 복제불능 아데노바이러스를 이용하면 이들 아데노바이러스에 감염된 세포들과 그 주변에서만 제한적으로 삽입된 유전자의 발현을 증폭시켜서 유전자의 효과를 지속적으로 유도할 수 있게 된다. 이러한 복제불능 아데노바이러스는 항종양 유전자 치료에서는 감염된 세포들과 그 주변에서만 제한적으로 항종양 효과를 보이기 때문에 불리한 면이 있지만, 켈로이드와 같은 섬유성 질환과 허혈 피판의 생존을 증가시키는 목적으



**Fig. 8.** Microscopic image of VEGF immunohistochemistry (× 200). The expression of VEGF was increased in RLX group (arrow: brown area, the site of VEGF expression).



**Fig. 9.** The quantitative analysis of VEGF expression. The expression of VEGF in RLX group was significantly increased (\*: Significant difference,  $p < 0.05$ ).

로는 적합하다고 볼 수 있다.

최근 Relaxin이 생식기관에 작용하는 것 이외에도 여러가지 효과를 가지고 있다는 것이 밝혀지고 있다.<sup>1,3</sup> 이 중에서 혈관에 대한 영향을 살펴보면 Relaxin은 세동맥, 모세혈관, 세정맥 등의 혈관확장시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 혈관확장 효과는 산화질소 (nitric oxide, NO)의 합성 증가를 통해서 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 이와 같은 Relaxin의 효과는 심장과 신장 등에서 혈류역동학적 효과 (hemodynamic effect)를 보이는 것으로 보고되고 있다. 또한 Relaxin은 트롬빈이나 콜라겐에 의한 혈액응고를 막으며, 투여한 후 일정시간이 지나면 혈소판 수치도 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다. 그리고 Relaxin의 투여를 통하여 피판 괴사에 중요 역할을 하는 중성구 (neutrophil)가 혈관내피세포에 부착 (adhesion)하는 것을 방지할 수 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>13,14</sup>

저자들은 이와 같은 Relaxin의 효과가 허혈 피판의 생존을 증가시키는데 작용을 할 수 있을 것으로 생각하고, 이를 증명하고자 하였다. 하지만 Relaxin의 인체 내에서의 생물학적 반감기는 4분 내외로 아주 짧아서 직접적인 투여로서는 한계가 있으므로, Relaxin 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 이용하여 본 실험을 계획하였다.

그 결과 피판의 생존 면적은 Relaxin 투여군에서 수술 후 10일까지 다른 군에서보다 높게 나타났다. 하지만 그 생존 면적의 차이는 시간이 지날수록 감소하여 수술 후 3일과 7일째에는 통계적으로 의미있는 차이를 보였으나, 10일째에는 통계적 유의성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 또한 Laser Doppler를 이용한 혈류량 측정에서는 피판 근위부의 경우 수술 직후 (전처치 48시간 후) Relaxin 투여군의 혈류량이

다른 군에서보다 높게 나타났다. 이 같은 결과는 Relaxin이 피판의 지연술에도 사용될 수 있는 가능성을 보여준다고 하겠다. 하지만 전처치의 효과는 3×9cm에 달하는 피판의 원위부까지 의미있게 나타나지는 않았다. Relaxin에 의한 혈류량 증가 효과는 수술 후 10일째까지 지속되는 것으로 나타났으며, 다른 군과의 차이는 시일이 지날수록 오히려 더 커지는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 이는 피판 생존율의 차이가 수술 후 10일째에는 통계적으로 유의하지 않게 나타난 것과는 상반된 결과인데, 수술 후 허혈 상태에서 이미 손상된 조직이 혈류량 증가에 의해서도 회복되지 못하고 시일이 지나면서 육안으로 확인될 정도로 괴사가 진행되기 때문인 것으로 생각된다. 조직 내 혈관 개수 측정에서도 Relaxin 투여군이 다른 군에 비해서 통계적으로 유의하게 증가된 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 VEGF 면역염색에서 VEGF 발현이 의미 있게 증가된 것으로 재차 확인되었다 (Fig. 8, 10).

다만 본 연구에서는 아데노바이러스를 벡터로 하여 투여한 Relaxin 유전자가 실제로 조직 내에서 얼마나 발현되었는지 측정하지 못하였다. 추후 피판조직을 Relaxin에 대한 면역조직화학 염색하여 Relaxin의 발현 정도를 평가해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한 아데노바이러스 벡터보다 조직 내에서 Relaxin의 발현을 더 오래 지속할 수 있는 매개체에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 최근에 Zheng, Y 등은 중간엽 줄기세포에 VEGF 유전자를 형질 도입시킨 후 쥐의 허혈성 피판에 주입하여 VEGF의 발현 정도가 증가하였으며 줄기세포의 혈관신생 효과가 더욱 극대화 되었다는 연구결과를 발표하였다.<sup>15</sup> 이는 조직 내에서 분화하여 생착이 가능한 줄기세포에 VEGF를 발현하는 유전자를 형질도입하여 VEGF가 더 지속적으로 발현될 수 있었기 때문으로 생각된다. 따라서 Relaxin을 발현하는 아데노바이러스를 이용하여 줄기세포에 Relaxin 유전자를 형질 도입하고, 이러한 줄기세포를 이용해 허혈성 피판의 생존율에 대한 연구를 진행한다면 그 결과가 더 우수하게 나타날 것으로 기대된다.

### V. 결 론

Relaxin을 발현하는 adenovirus를 쥐의 국소피판에 주입하였을 때 VEGF의 발현이 증가되고 모세혈관의 수가 증가하며, 피판의 혈류가 증가하여 피판의 생존율이 높아지는 것으로 나타났다.

### REFERENCES

1. Sherwood OD: Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* 25: 205, 2004
2. Unemori EN, Erikson ME, Rocco SE, Sutherland KM, Parsell

- DA, Mak J, Grove BH: Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells *in vitro* and is associated with menorrhagia in women. *Hum Reprod* 14: 800, 1999
3. Samuel CS, Hewitson TD, Unemori EN, Tang ML: Drugs of the future: the hormone relaxin. *Cell Mol Life Sci* 64: 1539, 2007
  4. Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO: Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* 98: 1482, 2006
  5. Khan A, Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Kontos C, Zhong A, Forrest CR, Pang CY: Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1219, 2004
  6. Kerrigan CL: Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 72: 766, 1983
  7. Hopper RA, Forrest CR, Xu H, Zhong A, He W, Rutka J, Neligan P, Pang CY: Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R666, 2000
  8. Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, Quan EE, Barker JH: Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid a. *Plast Reconstr Surg* 111: 267, 2003
  9. 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
  10. Scalise A, Tucci MG, Lucarini G, Giantomassi F, Orlando F, Pierangeli M, Pugnaroni A, Bertani A, Ricotti G, Biagini G: Local rh-VEGF administration enhances skin flap survival more than other types of rh-VEGF administration: a clinical, morphological and immunohistochemical study. *Exp Dermatol* 13: 682, 2004
  11. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA: Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* 370: 203, 1995
  12. Huang N, Khan A, Ashrafpour H, Neligan PC, Forrest CR, Kontos CD, Pang CY: Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H127, 2006
  13. Bani D, Maurizi M, Bigazzi M: Original article: relaxin reduces the number of circulating platelets and depresses platelet release from megakaryocytes: studies in rats. *Platelets* 6: 330, 1995
  14. Bani D, Bigazzi M, Masini E, Bani G, Sacchi TB: Relaxin depresses platelet aggregation: *in vitro* studies on isolated human and rabbit platelets. *Lab Invest* 73: 709, 1995
  15. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, Guo S: Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 121: 59, 2008