

Botulinum toxin에 의한 가토외안근 신경근접합부의 형태학적 변화

이 세 엽 · 김 상 표

= 요 약 =

Botulinum toxin type A (BtA)를 가토의 상직근에 주사한 뒤 1일에서 8주 사이에 상직근을 채취하여 조직학적인 검사를 실시하였다. BtA주사후 전자현미경적으로 가장 현저한 소견은 초기에 근형질내 조직의 공포화, 근원섬유의 광범위한 손상, 시냅스후 주름의 변성, 연접간격이 넓어지는 것이었다. 근섬유는 특별한 조직학적 후유증이 없이 나중에 재생되었지만, 대부분의 신경근접합부의 변성은 주사후 8주에도 지속되었다. 가토 연령에 따른 근독성의 차이를 비교해 볼 때 외안근이 성숙되고 있는 생후 2개월의 어린 가토에서 생후 6개월 이상된 성숙한 가토 보다 더 심한 조직학적 손상을 나타내었다. AchE의 발현을 보이는 근섬유의 수는 BtA 주사군과 대조군을 비교해 볼 때 BtA 주사군에서 대조군 보다 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 이상으로 본 연구의 가토 상직근 근형질 조직의 초기에 공포화와 변성, 시냅스후 주름의 변성은 BtA의 직접적인 근독성에 의한 소견으로 생각된다(한안지 38:2214~2222, 1997).

= Abstract =

Botulinum Toxin Induced Morphological Changes in the Rabbit Extraocular Muscle and Myoneuronal Junction

Se Youp Lee, M.D., Sang Pyo Kim, M.D.*

After direct superior rectus muscle injection of BtA in rabbit eyes, we examined the ultrastructural changes of the muscles from 1 day to 8 weeks

〈접수일 : 1997년 5월 30일, 심사통과일 : 1997년 8월 13일〉

계명대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

계명대학교 의과대학 병리학교실*

Department of Pathology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea*

* 본 논문의 요지는 1997년 4월 19일 제78회 대한안과학회 춘계학술대회에서 구연 발표된 바 있음

* 본 연구는 1997년 계명대학교 동산의료원 특수과제 연구비의 보조로 이루어진 것임

after injection. The most profound changes seen at electron microscopic levels after BtA injection were early vacuolization of the sarcoplasmic structure, extensive damage of myofibril, degeneration of the postjunctional fold and widening of the synaptic cleft. Myofiber changes were reversible with no apparent long-term consequence. However, most of the degenerations of myoneuronal junction were still present in 8 weeks post-injection. Comparing myotoxic effects according to rabbit age, the botulinum toxin seems to make more severe histologic damage in the fibers of the two-month old than six-month old or older. AchE activity of injection group is mildly decrease in number of positive fibers rather than control group, which was not statistically significant in the quantitative analysis. In conclusion the early vacuolization and degeneration of the sarcoplasmic structure, and degeneration of the postjunctional folds after toxin injection in the muscles are most likely due to a direct myotoxic effect of BtA (J Korean Ophthalmol Soc 38:2214~2222, 1997).

Key Words : Acetylcholinesterase, Botulinum toxin type A, Myoneuronal junction, Myotoxic

Botulinum toxin type A(BtA)는 Clostridium botulinum과 Clostridium barati에서 생성되는 8 종류의 신경독소 중의 하나로서 근육에 소량 주사시 신경근접합부에서 acetylcholine의 분비를 억제시켜 근육을 약화시키는 것으로 알려져 있다¹⁻⁴⁾. BtA는 1980년 Scott⁵⁾에 의하여 임상적으로 사시치료에 제일 먼저 사용된 이후로 현재는 사시수술후 20 prism diopters이내의 부족 혹은 과교정된 경우, 영아내사시, 성인 간헐외사시, 갑상선 질환에 의해 이차적으로 생긴 사시의 치료에 많이 사용되고 있다. 그리고 현재까지 BtA의 근독성 효과를 증명하기 위하여 BtA가 신경근접합부와 근섬유에 미치는 형태학적인 변화와 그 작용기전에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이에 저자들은 BtA에 의한 신경근접합부와 근섬유의 형태학적 변화와 뒤이은 재생, 가토의 나이에 따른 조직학적 손상의 정도를 알아보고, Acetylcholine의 분해효소인 AchE의 정량적 분석을 위하여 백색가토의 상직근에 BtA를 주사후 투과전자현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

대상은 생후 2개월, 체중 1.0kg이하, 백색가토

20마리를 1군, 생후 6개월 이상이고 체중 2.0kg 이상되는 20마리를 2군으로 하였다. BtA를 주사하기 전에 가토의 마취는 Ketamine(10mg/kg)과 Rompun(1-2mg/kg)을 동량으로 혼합하여 근육주사하였다. 본 실험에 사용된 Botulinum toxin type A는 Botox (Allergan company, Inc., Irvine, U.S.A.)이었고, Botox의 약제의 주입은 우안 상직근에 2.5 unit, 좌안 상직근에는 대조군으로 0.9% 생리식염수를 주사하였다. 주사방법은 proparacaine hydrochloride를 점안 후 결막을 통하여 EMG(Electromyogram) guide하에 근 부착지점에서 2mm 떨어진 지점에서 27 guage monopolar 주사침을 꽂은 후 외안근을 따라 약 4mm 후방으로 서서히 삽입하여 EMG amplifier에서 cracking sound가 들릴 때 약제를 주사하였다. 주사후에는 감염을 방지하기 위하여 chloramphenicol(opticle) 안용액을 결막낭에 점안하였고, 결막부종, 출혈, 염증 등을 관찰하였다. 주사후 결막하 출혈 혹은 감염되어 염증이 심한 가토는 대상에서 제외하였다. 주사후 1일, 3일, 1주, 2주, 3주, 6주, 8주에 다량의 마취약제로 가토를 희생시켜 결막을 통하여 양안의 상직근을 조심스럽게 박리한 후에 채취하였다.

투과전자현미경적 관찰은 적출된 가토 외안근 조

직편을 1mm의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1-4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1M phosphate buffer solution(0.1M PBS)으로 세척한 후 1% OsO₄용액에 2시간 후고정을 실시한 다음 같은 완충용액으로 세척을 하여 계열에탄올로 탈수하였다⁶. Propylene oxide로 치환한 후 Luft 방법⁷에 의한 epon혼합물로 포매하여 37°C에서

12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절한 후 toluidine blue염색을 하여 관찰부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000 형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(60-90nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson⁸ 및 Reynolds⁹ 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

가토상직근의 신경근접합부에 대한 AchE 조직화학적 관찰은 Meier-Ruge 등¹⁰에 의해 변형된 Karnovsky와 Roots¹¹의 방법을 사용하였다. 적출된 가토 외안근을 -70°C의 isopentane에 약 10초 가량 넣어 동결시킨 다음 -20°C의 동결절편기에서 OCT(optimal cutting temperature)블록을 만든 후 4°C의 4% neutral formalin에 5분간 고정한 다음 37°C의 coplin jar에서 혼합한 incubation medium part A and B(Table 1)로 처리하여 37°C에서 60분간 incubation하였다. 동결조직절편을 증류수로 세척하고 hematoxylin으로 대조염색을 시행한 다음 absolute ethanol을 이용하여 탈수를 실시한 후 canada balsam으로 봉입하였다. 결과 관찰은 가토 외안근의 신경근접합부에서 분명한 갈색으로 염색되는 것 만을 양성 소견으로 인정하였으며 정량적인 분석은 광학현미경 ×200배 시야에서 무작위로 3시야를 선정한 후 가토 외안근 신경근접합부에서 AchE의 발현을 보이는 근섬유의 수를 세어 평균을 낸 다음 대조군과 비교하여 실험군을 Wilcoxon의 부호순위 방법을 이용한 평균차이 검정을 실시하였고, P<0.05일 경우에 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 투과전자현미경적 소견

대조군: 1군 및 2군 백색가토군에서 모두 근세사 다발들이 비교적 잘 유지되어 Z대를 가지고 있었고, 핵은 근섬유의 주변부에서 보였으며 미토콘드리아들이 근섬유막하(subsarcolemmal)에서 관찰되었다. 또한 신경근접합부가 근다발의 근섬

Fig. 1. Control group. Normal neuromuscular junction showing axon terminal (arrows) with containing many synaptic vesicles and regular arrangement of invaginated postjunctional folds (arrowheads). Also there are myofibrils with distinct Z-band and well preserved sarcomere. (TEM, original magnification ×10,000).

Table 1. Incubation medium part A and B

Incubation medium part A	
Acetylcholine iodide	0.24g
0.06M Sodium acetate 3H ₂ O	302.4ml
0.1M Acetic acid	9.6ml
0.1M Sodium citrate	24ml
0.03M Copper sulfate 5H ₂ O	48ml
0.004M Tetraisopropyl prophosphoramido	9.6ml
Distilled water	37.2ml
Snap freeze and store in volumes of 9ml at -25°C	
Incubation medium part B	
Potassium ferricyanide	0.165g
Distilled water	100ml
Store in volumes of 1ml at -25°C	

— 이세엽 외 : B. toxin 변화 —

유막하에 연하여 관찰되었으며 규칙적으로 함입된 시냅스후 주름(postjunctional fold)를 가지고 있었다. 그리고 축삭종말내에는 많은 연접소포

(synaptic vesicle)들이 보였다(Fig. 1).

실험군: 주사후 3일에 1군과 2군 백색가토군에서 신경근접합부는 대조군과 비교할 때 특이한 변화가 관찰되지 않았으며 근세사의 경미한 변성 소

Fig. 2. Seven days after intramuscular BtA injection(Group 2). Dispersed large mitochondria (arrows) and some tubular aggregates (arrowheads) in the subsarclemmal area. There are vacuoles and fat droplets formation. (TEM, original magnification X 8,000).

Fig. 4. Two weeks after intramuscular BtA injection(Group 1). Terminal axon sprouting (arrows) and completely loss of postjunctional folds (arrowheads) are seen. (TEM, original magnification X 12,000).

Fig. 3. Two weeks after intramuscular BtA injection(Group 2). Massive aggregates of mitochondria in the axon terminal (arrows) and partially loss of postjunctional folds (arrowheads). Myofibrils showing markedly degenerated and swelling (TEM, original magnification X 12,000).

Fig. 5. Three weeks after intramuscular BtA injection(Group 2). A gap (arrows) between presynaptic and postsynaptic membrane is more widened. There are still prominently axonal sprouting and loss of postjunctional folds. Some area of regeneration in damaged myofibrils. (TEM, original magnification X 10,000).

경이 관찰되었다. 주사후 7일부터 근섬유막하에서 미토콘드리아의 분산이 저명하였고 관상옹집(tubular aggregates)들이 출현하기 시작하였으며 공포화(vacuolization)의 지방소적을 보이는 근세사 변성이 현저하여 근절(sarcomere)의 Z대가 소실되고 비교적 큰 미토콘드리아가 근섬유막 하에서 응집되어 존재하였다(Fig. 2). 주사후 2주에는 축삭종말에 미토콘드리아가 광범위하게 응집되었고 시냅스후 주름은 부분적으로 소실되었으며 근세사들의 변성소견은 더욱 더 현저하였다(Fig. 3). 그리고 주사후 2주에는 축삭발아 소견을 나타내었고 시냅스후 주름은 완전히 소실되었다(Fig. 4). 주사후 3주부터는 시냅스전막(presynaptic membrane)과 시냅스후막(post-synaptic membrane)이 떨어져 있는 양상을 보였고, 손상 받은 근세사의 재생이 부분적으로 관찰되기 시작하였으며, 시냅스후 주름의 변성 및 축삭발아가 현저하였다(Fig. 5). 주사후 6주의 신경근접합부 소견은 3주의 소견과 거의 동일하였고 근섬유 재생이 부분적으로 활발하였다(Fig. 6). 주사후 8주에는 근세사가 비교적 광범위하게 재생되었고(Fig. 7A), 부분적으로 균원성 위성세포(myogenic satellite cell)내에서 근세사가 재생되는 소견을 보였고 시냅스후 주름은 여전히 변성되어 있었다(Fig. 7B). 전체적으로 1군과 2군의 BtA에 의한 근독성을 비교해 볼 때 근세사의 경우는 1군에서 광범위한 변성을 나타내었지만(Fig. 8A) 2군에서는 부분적으로 근세사가 변성된 소견을 나타내었고(Fig. 8B), 신경근접합부의 시냅스후 주름의 경우 1군에서는 완전히 소실된 경우가 많았지만(Fig. 4) 2군에서는 부분적으로 소실되어 있었으므로(Fig. 3), 대부분 1군에서 2군 백색가토군 보다 근세사 및 신경근접합부의 손상정도가 더 심하였다.

2. 가토외안근의 신경근접합부에 대한 AchE 조직화학적 소견

대조군: 가토 외안근의 신경근접합부에서 AchE 발현은 각각의 근섬유들의 주변에서 진한 갈색으로 염색되었고 AchE 발현은 보이는 근섬유의 수는 평균 109 ± 13.1 이었다. 1군과 2군 백색가토군에서 각기 활성도의 차이는 관찰할 수 없었다.

실험군: 2군에서 주사후 1일, 3일, 1주, 3주 및 6주에서 AchE 발현을 보이는 근섬유 수는 107 ± 24.1 , 101 ± 12 , 107 ± 12.1 , 94 ± 7.9 와 90 ± 14.3 으로써 대조군과 비교하여 볼 때 약간 감소하는 경향을 보였으나 각 실험군을 Wilcoxon의 부호순위 방법을 이용한 평균차이 검정

Fig. 6. Six weeks after intramuscular BtA injection (Group 2). The findings of neuromuscular junction showing same as above three weeks after injection. Some area of regenerating myofibrils are present (arrows). (TEM, original magnification $\times 10,000$).

Fig. 7. Eight weeks after intramuscular BtA injection (Group 2). Note mostly regenerating myofibrils (A) and scattered myoblasts in focal area (B). (TEM, original magnification $\times 10,000$).

— 이세엽 외 : B. toxin 변화 —

상 유의한 차이가 없었다($P>0.05$) (Fig. 9A, B).

고 찰

Botulinum toxin은 면역학적으로 A, B, C₁, C₂, D, E, F, G의 8 종류로 나뉘어 지는데, 그 중에서 A는 안정되고, 조제하기 편리하며, 그 효과가 강력하여 널리 사용되고 있다. Botulinum toxin type A는 heavy chain과 light chain으로 구성된 dichain polypeptide로서 분자량은 150,000 dalton으로 알려져 있다²⁾. 그리고 BtA의 독성에 대하여 Bonventre와 Kempe¹²⁾는 세포가 성장하는 동안에 독성이 약한 protoxins, progenitor toxins 형태로 합성되어 있다가 세포가 용해되면서 내인성 혹은 외인성 단백질 분해효소(protease)에 의하여 강한 독성을 얻게 된다고 하였다.

BtA의 골격근에 대한 마비 기전은 BtA가 시냅스전막에 있는 수용체에 결합하여 신경종판내로 들어가서 Ach의 분비를 억제하는 것으로 알

려져 있으나^{1,2)} 신경종판내에서 BtA의 역할에 대하여서는 현재까지 확실하게 밝혀지지 않았다. Hirokawa 등¹³⁾은 신경종판내에서 BtA의 역할에 대하여 신경이 탈분극될 때 반드시 동반되는 세포내로의 Ca 유입을 BtA가 억제하므로 신경전도가 차단된다고 하였고, Blasi 등¹⁴⁾은 축삭종말내에서 연접소포가 밖으로 분비할 때 관여하는 시냅스막 단백질(synaptic membrane protein)인 SNAP(synaptosomal-associated protein)-25 를 BtA가 선택적으로 분해시켜 Acetylcholine의 분비가 억제된다고 하였다.

BtA 주사후 외안근의 조직학적 소견을 보면 본 연구의 경우 주사후 7일에 근섬유막하에서 미토콘드리아의 능선이 소실되고 미토콘드리아가 근형질의 주변부로 웅집되기 시작하였고 근형질 내에는 공포화 소견을 나타내었다. Spencer와 McNeer¹⁵⁾에 의하면 미토콘드리아가 근형질 주변부로 이동하는 것은 BtA에 의해 모세혈관망이

Fig. 8. Infant rabbit with aged 2 months (A) versus adult rabbit with aged 6 months or older (B). Two weeks after intramuscular BtA injection. (A) Note relatively diffuse degeneration of the myofibrils. (B) There are partially degeneration of myofibrils in the subsarcolemmal area. (A, B: TEM, original magnification $\times 8,000$).

Fig. 9. Control group (A) versus group for three weeks after intramuscular BtA injection (B). (A) Acetylcholinesterase activity showing diffusely positive reactions in the periphery of muscle fibers. (B) Acetylcholinesterase activity of injection group is mildly decrease in number of positive fibers rather than control group, which show not statistically significant in the quantitative analysis. (A, B: Acetylcholinesterase histochemistry, original magnification $\times 100$).

줄어들기 때문에 생기는 허혈성 반응이라고 하였고, 주사후 42일에서 56일에 정상적인 형태와 위치로 돌아온다고 하였다. Hassan 등¹⁶⁾은 BtA 주사후 근형질내에 다양한 크기의 공포들을 관찰하였는데 주로 운동종판(motor endplate) 아래에서 많이 보였고 이 속에는 조직파편, 골수양 모양(meloid figure)의 물질이 들어 있었다고 하였다. 신경근접합부의 변화를 살펴보면 본 연구에서는 1주에는 별 변화가 없었던 시냅스후 주름이 2주에 부분적인 소실이 관찰되기 시작하였고 3주에는 시냅스전막과 후막이 떨어져 연접간격이 넓어진 소견을 나타내었다. Hassan 등¹⁶⁾은 근형질내에 공포화, 시냅스후 주름의 소실은 BtA의 단백분해 작용에 의해 발생되고 주사후 4주에서 8주 사이에 볼 수 있다고 하였는데, 저자들의 2주와 비교해 볼 때 약간 늦게 관찰되었다. Pulliam과 April¹⁷⁾도 쥐를 이용하여 신경절단을 시행한 후에 신경근접합부의 종판에서 연접간격이 21일 동안 넓어진 소견을 관찰할 수 있었다고 하였고, 저자들의 경우는 8주까지 지속되었다.

Sprouting은 전에 존재하였던 종판이 BtA에 의해 기능을 못하게 되어 이에 대한 보상으로 새로운 신경근접합부의 형성을 의미하는 소견이다. Wojno 등¹⁸⁾은 BtA 주사후 수일부터 축삭의 sprouting 및 운동신경종판의 변화가 오며 이러한 변화는 8주까지 지속된다고 하였고, 또 그는 6주후 sprouting 소견으로서 연축섬유에서 시냅스후 주름이 없는 신경종판이 자주 보이고 특히 저근섬유(slow fiber)의 신경근접합부에서 sprouting이 관찰되었다고 하였다. Brown과 Intron¹⁹⁾은 근육내 신경의 sprouting 증거로서 전종말축삭(pre-terminal axon)의 비대 및 새로운 신경섬유의 접촉형성을 제시하였다. 국내에서 문 등²⁰⁾도 6주후에 축삭형질(axoplasm)과 신경초가 정상적으로 회복되는 경향을 보였으며 sprouting의 시초라고 할 수 있는 곳도 관찰되었다고 하였다. 본 연구에서는 주사후 2주에 처음으로 축삭발아 소견을 나타내었고 3주부터는 현저하였다.

근세사의 변성은 본 연구의 경우 1주에 나타나기 시작하여 2주에는 알아 보기 힘들 정도로 근세사의 광범위한 손상을 나타내었고 특히 1군의

어린 가토에서 더 심하였다. Hassan 등¹⁶⁾도 1주와 2주사이에 Z대와 횡문의 소실과 같은 근세사의 변성을 볼 수 있었다고 하였고, Spencer와 McNeer¹⁵⁾는 신경근접합부의 신경전도가 차단되기 때문에 근세사는 미분화 상태로 된다고 하였다. 국내에서도 문 등²⁰⁾은 주사후 3일에 근섬유내 국소적인 부종과 근세사의 소실을 관찰할 수 있었다고 하였다. Tagerud 등²¹⁾에 의하면 근세사의 변성은 근형질내에 리소솜 효소인 cathepsin D 등이 증가하기 때문이라고 하였다. 근섬유의 재생은 근섬유의 기저판에 존재하는 근원성 위성세포에 의하여 이루어지는데, 본 연구에서도 주사후 8주에 이들의 세포질내에서 많은 근세사 다발을 볼 수 있었다.

Acetylcholinesterase는 분비된 acetylcholine을 choline으로 가수분해시키는 효소이다. BtA에 의해 acetylcholine의 분비가 억제되면 이를 가수분해시키는 AchE의 변화에 대하여 Duchen²²⁾은 AchE는 정상적으로는 신경하장치(subneurial apparatus)에 분포하지만 BtA 주사후에는 축삭발아있는 곳을 따라서 발견된다고 하였다. 본 연구에서는 acetylcholine의 분비 억제에 따른 AchE의 변화를 알아보기 위하여 Karnovsky와 Roots 방법¹¹⁾의 조직학적 염색을 실시하여 AchE를 정량적으로 분석하였다. 그 결과는 BtA주사한 군에서 대조군에 비하여 AchE가 약간 감소되는 경향을 나타내었는데 이는 Acetylcholine의 분비가 억제되기 때문에 이를 분해하는 AchE도 수적으로 감소되지 않았나 생각되나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

현재 BtA는 성인사시 뿐만 아니라 유아 내사시에도 사용되고 있으므로 본 연구에서 나이에 따른 근독성의 차이를 비교해 보았다. 저자들의 경우 외안근이 아직도 성숙중인 1군에서 2군 보다 근세사와 신경근접합부의 변성이 더 심한 것으로 나타났고, Spencer 등²³⁾도 성숙한 원숭이 보다 1살 미만의 원숭이에서 BtA에 의한 근독성이 더 심했다고 보고하였다. 이것으로 보아 외안근이 성숙하는 생후 1세 미만의 시기에 영아내사시에 대한 BtA의 사용은 근세사와 신경근접합부의 광범위한 손상을 주므로 세심한 주의가 필요할 것으로

생각된다.

이상으로 BtA 주사후 초기의 특징적인 근독성 소견으로는 근세사의 광범위한 손상, 시냅스후 주름의 소실, 연접간격이 넓어졌으며, 뒤에 재생되는 소견으로는 근원성 위성세포에 의해 근세사가 복원되었고 신경근접합부의 기능적인 회복을 의미하는 sprouting을 볼 수 있었다. 주사후 8주에도 시냅스후 주름은 여전히 변성되어 있어 신경근접합부에 대한 BtA 독성이 근세사 보다 오래 지속되었다. 그리고 향후 연접간격, 시냅스후 주름의 변화와 재생을 관찰하기 위하여서는 보다 장기간의 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Simpson LL : *Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin*. Ann Rev Pharmacol Toxicol 26:427-453, 1986.
- 2) Sellin LC : *The action of botulinum toxin at the neuromuscular junction*. Med biol 59:11-20, 1981.
- 3) Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK : *Extraocular muscles: Basic and clinical aspects of structure and function*. Surv Ophthalmol 39:451-484, 1995.
- 4) 김재찬, 구현남, 구본술 : 안외상으로 인한 안근육 운동장애에 대한 Botulinum toxin 치료 예. 한안지 29:425-432, 1988.
- 5) Scott AB : *Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery*. Ophthalmology 87:1044-1049, 1980.
- 6) Fujita H : *Procedures from fixation to embedding*. J Clin Electron Microsc 21:s31-s35, 1989.
- 7) Luft JH : *Improvement in epoxy resin embedding method*. J Biophys Biochem Cytol 9:409-417, 1961.
- 8) Watson ML : *Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals*. J Biophys Biochem Cytol 6:475-479, 1958.
- 9) Reynolds ES : *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy*. J Cell Biol 17:208-212, 1963.
- 10) Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Scharli A : *Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease*. J Pediatr Surg 7:11-17, 1972.
- 11) Karnovsky MJ, Roots L : *A "direct coloring" thiocholine method by cholinesterase*. J Histochim Cytochem 12:219-221, 1964.
- 12) Bonventre PF, Kempe LL : *Physiology of toxin production by Clostridium botulinum types A and B. IV. Activation of toxin*. J Bacteriol 79:24-32, 1960.
- 13) Hirokawa N, Heuser JE, Evans L : *Structural evidence that botulinum toxin blocks neuromuscular transmission by impairing the calcium influx that normally accompanies nerve depolarization*. J Cell Biol 88:160-171, 1981.
- 14) Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, Camilli PE, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R : *Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25*. Nature 365:160-163, 1993.
- 15) Spencer RF, McNeer KW : *Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle*. Arch Ophthalmol 105:1703-1711, 1987.
- 16) Hassan SM, Jennekens FG, Veldman H : *Botulinum toxin-induced myopathy in the rat*. Brain 118:533-545, 1995.
- 17) Pulliam DL, April EW : *Degenerative changes at the neuromuscular junctions of red white and intermediate muscle fibers. Part 1 Response to short stump nerve section*. J Neurol Sci 43:205-222, 1979.
- 18) Wojno T, Philip C, John W : *Orbicular muscle pathology after botulinum toxin injection: Ophthalmic plastic and reconstructive surgery 2. 1st ed, Missouri, C.V. Mosby, 1986, pp. 71-74*.
- 19) Brown MC, Intron R : *Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles*. J Physiol 278:325-348, 1978.
- 20) 문남주, 양석환, 천중섭, 김재찬 : Botulinum toxin A 단독 및 Verapamil 병용투여 후 가토 상직근의 신경재생에 관한 연구. 한안지 34:774-783, 1993.
- 21) Tagerud S, Libelius R, Thesleff S : *Effects of botulinum toxin induced muscle paralysis on endocytosis and lysosomal enzyme activities in*

- mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch* 31:275-278, 1985.
- 22) Duchen LW : Changes in motor innervation and cholinesterase localization induced by boulinum toxin in skeletal muscle of the mouse: differences between fast and slow muscles. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 33:40-54, 1970.
- 23) Spencer RF, Tucker MG, McNeer KW, Porter JD : Experimental studies of pharmacological and surgical denervation of extraocular muscles in adult and infant monkeys, in Scott AB(ed) : The mechanics of strabismus: A symposium on oculomotor engineering. San Francisco, Smith-Kettlewell eye research institute, 1992, pp 207-227.