

아래쪽배벽동맥피판의 생존향상을 위한 VEGF와 COMP-angiopoietin-1 유전자 치료

유은경¹ · 손대구¹ · 김형태² · 이인규³ · 최태현¹ · 김준형¹ · 한기환¹

계명대학교 의과대학 성형외과학교실¹, 외과학교실², 경북대학교 의과대학 내분비내과학교실³

Improvement of the Inferior Epigastric Artery Flap Viability Using Adenovirus-mediated VEGF and COMP-angiopoietin-1

Eun Kyung Yoo, M.D.¹, Daegu Son, M.D.¹,
 Hyung Tae Kim, M.D.², In Kyu Lee, M.D.³,
 Taehyun Choi, M.D.¹, Junhyung Kim, M.D.¹,
 Kihwan Han, M.D.¹

Departments of ¹Plastic and Reconstructive Surgery and
²General Surgery Keimyung University School of Medicine,
 Daegu; ³Department of Internal Medicine, Kyungpook
 National University School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: Partial necrosis of skin flaps remains a substantial problem in reconstructive surgery. We investigated the potential use of an adenovirus vector encoding the VEGF, COMP-angiopoietin-1 gene in an attempt to promote the viability of the inferior epigastric artery flap in a rat model.

Methods: Three by six cm lower abdominal transverse skin flaps, supplied only by the left inferior epigastric artery, were designed. After skin flap elevation, the adenovirus VEGF and adenovirus COMP-angiopoietin-1 were injected into the distal portion of the flap, which has a high tendency of developing flap ischemia. Control animals were injected with the same volume of normal saline. On 3, 7 and 14 days after the flap elevation, the flap survival and vascularization were assessed using Visitrak digital[®], CD31 immunohistochemistry in addition to evaluating the general histological characteristics.

Results: There was a significant increase in the mean percentage of flap viability by 89.8%, 91.1% and 94.8% in flaps transfected with adenovirus VEGF, COMP-angiopoietin-1, coadministration of VEGF and COMP-angiopoietin-1 at seven days, and by 95.6%, 94.8% and 96.3% at 14 days. Histological assessment revealed that there were more blood vessels formed after adenovirus

with VEGF, COMP-angiopoietin-1 or VEGF plus COMP-angiopoietin-1 than with adenovirus Lac Z.

Conclusion: The results of this study suggest that adenovirus-mediated VEGF, COMP-angiopoietin-1 gene therapy, promote therapeutic angiogenesis in patients that undergo reconstructive procedures.

Key Words: VEGF, Angiopoietin, Gene therapy, Flap

I. 서 론

일차 봉합수술이나 피부이식술 등으로 치료하기 힘든 창상에서 피판의 사용은 불가피하다. 원칙에 따라 시행한 피판수술은 대부분 잘 생존하지만 때로는 피판의 일부가 허혈에 빠져 괴사되는 경우도 만나게 된다. 피판의 생존을 높이기 위한 연구는 조직의 허혈을 개선하는데 역점을 두고 있다. 조직이 정상적인 기능을 하기 위해서는 혈관을 통한 산소와 영양분의 적당한 공급이 절대적으로 필요하기 때문이다. 피판의 허혈을 방지하고 생존율을 높이기 위해서 자연치치를 하거나,^{1,2} 교감신경 차단제, 혈관화장제, 칼슘경로차단제와 같은 약물을 이용하여 술전 혈관신생(angiogenesis)을 유도하거나,³⁻⁵ 신생혈관증식(neovascularization)을 촉진하는 폴리펩티드 성장인자(polyptide growth factor)를 직접 투여하는 연구⁶들이 활발하게 이어져 오고 있다.

혈관신생을 촉진하는 성장인자로 주목받고 있는 것은 vascular endothelial growth factor(VEGF), angiopoietin, platelet-derived growth factor(PDGF), transforming growth factor-beta 1(TGF-β1), fibroblast growth factor(FGF), hepatocyte growth factor(HGF), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), ephrin-B2 등이다. 이들 중 VEGF와 angiopoietin 그리고 ephrin-B2가 결합하여 작용을 나타내는 수용체가 혈관내피세포(endothelial cell)에만 선택적으로 존재하기 때문에 다른 촉진인자들에 비해 더 많이 연구되고 있다.⁷

특히, VEGF는 혈관내피세포를 분열 증식시키며 동시에 혈관의 투과성을 증가시키는 가장 강력한 물질로, 혈관신생에 있어 중요한 조절 인자이고 혈관내피세포의 이동,

Received August 4, 2008

Revised September 18, 2008

Accepted October 17, 2008

Address Correspondence: Daegu Son, M.D., Ph.D. Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University, Dongsan Medical Center, 194 Dongsan-dong, Daegu 700-712, Korea. Tel: 053) 250-7636 / Fax: 053) 255-0632 / E-mail: handson@dsmc.or.kr

관 형성, 기질 분해효소 분비, 생존의 촉진에도 가장 강력한 물질이며, VEGF의 혈관투과성 증가작용은 혈관신생의 초기 작용기전에 중요한 역할을 할 것으로 보고 있다.⁷

Angiopoietin1(Ang1)은 혈관내피세포에 선택적으로 존재하는 Tie2 수용체에 결합하여 활성화 시키는 ligand로써, 혈관내피세포에 혈관을 이루는 주변세포들을 모이게 하여 성숙된 혈관을 만들고 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고 있다.⁷ 본 연구에 사용한 COMP(cartilage oligomeric matrix protein)-Ang1은 Ang1과 유사한 기능을 갖고 있으면서 보다 안정하고 강력한 Ang1의 변형체이다.

성장인자로 작용하는 폴리펩타이드, 즉 단백질(protein)을 일시적으로 투여하기보다는 이를 만들어 내는 목적 유전자를 세포내에 직접 삽입함으로써 일시적으로 혹은 영구적으로 필요한 단백질을 만들어 내고자 하는 것이 유전자치료(gene therapy)이다. 성공적인 유전자 치료를 위해서는 목적 유전자의 선택적이고 효과적인 세포 전달 방법의 개발과 지속적인 유전자 발현이 필수적이다. 이러한 유전자 전달체는 크게 바이러스성(viral-based)과 비바이러스성(nonviral)으로 나눌 수 있으며, 이 중 바이러스성 유전자 전달체가 발현율 및 지속성 면에서 비 바이러스성 보다 우수하다. 바이러스성 유전자 전달체 중, 아데노바이러스(adenovirus)는 모든 포유류 세포, 분열세포와 비분열세포에서도 쉽게 전달이 되며 큰 사이즈의 유전자도 아데노바이러스에 삽입이 용이한 장점을 가지고 있다.

이 연구의 목적은 아래쪽배벽동맥피판 모델에서 adenovirus VEGF(Ad-VEGF)와 adenovirus COMP-Ang1(Ad-COMP-Ang1)을 각각 혹은 함께 투여하였을 때 피판의 생존에 어떠한 영향을 미치는지를 알아봄으로써 피판혈류 개선의 유전자 치료방법을 재시하고자 하는 것이다.

II. 재료 및 방법

가. Ad-VEGF, Ad-COMP-Ang1 그리고 Ad-Lac Z의 제조

E1/E3가 제거된 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1은 고규영 교수님(KAIST, 대전), adenovirus Lac-Z(Ad-Lac-Z)는 이인규 교수님(경북대학교, 대구)으로부터 제공받아 사용하였다. 아데노바이러스는 293 세포에서 증폭시켰으며 세슘 염화물(Cesium chloride)을 이용해 초원심분리하여 순수 아데노바이러스를 분리하였다. 아데노바이러스는 10% 글리세롤을 포함한 인산완충식염수에서 이를 동안 여막 투석한 후 분주하여 사용하기 전까지는 -70°C에 보관하였다. 바이러스 역가는 adeno-X™ Rapid Titer Kit (BD Biosciences, San Diego, CA)을 사용하여 측정하였으며 Lac Z는 본 논문에서 아데노바이러스에 대한 대조군으

로 사용하였다.

나. 동물실험

300 - 350 g의 SD(Sprague-Dawley) 백서를 사용하였고 사육실의 온도는 21 - 25°C, 습도 50 - 60%, 12시간의 명암을 주었으며 음수는 RO필터로 여과한 물을 급수병으로 주었다. Ketamine(Ketalar®; 유한양행, 서울, 한국) 90 mg/kg으로 마취시킨 후, 배부의 체모를 모두 제거하고 베타딘으로 소독하였다. 쥐의 하복부에서 좌측 아래쪽배벽동맥(inferior epigastric artery)만을 혈관경으로 하는 피부피판을 3 × 6 cm 크기로 일으켰다(Fig. 1). Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 각각 그리고 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 함께 그리고 Ad-Lac Z를 괴사의 가능성 이 가장 많은 피판의 원위부에 주사하였다. 농도는 10⁸ pfu(plaque-forming units)의 아데노바이러스를 인산완충식염수에 최종볼륨이 0.1 mL되도록 희석하여 피하층(subcutaneous layer)에 주사한 후 피판을 5 - 0 Chromic cat gut 봉합사로 원래의 자리에 봉합하였다. 대조군은 인산완충식염수를 같은 양으로 주사하였다.

다. 아데노바이러스의 발현 확인

Ad-Lac Z의 발현을 보기 위해 피판을 생검하여 코팅슬라이드에 붙인 다음 인산완충식염수에 0.05% Glutaraldehyde(SIGMA, St. Louis, USA)로 15분간 실온에 반응시켜 조직을 고정시켰다. 깨끗이 씻은 후 X-Gal(PROMEGA, USA)용액을 37°C에서 반응 후 탈수 과정을 거쳐 봉입하여 현미경(× 200)으로 관찰하였다.

라. 생존 면적 측정

피부피판의 생존은 아데노바이러스 투여 후, 육안적으

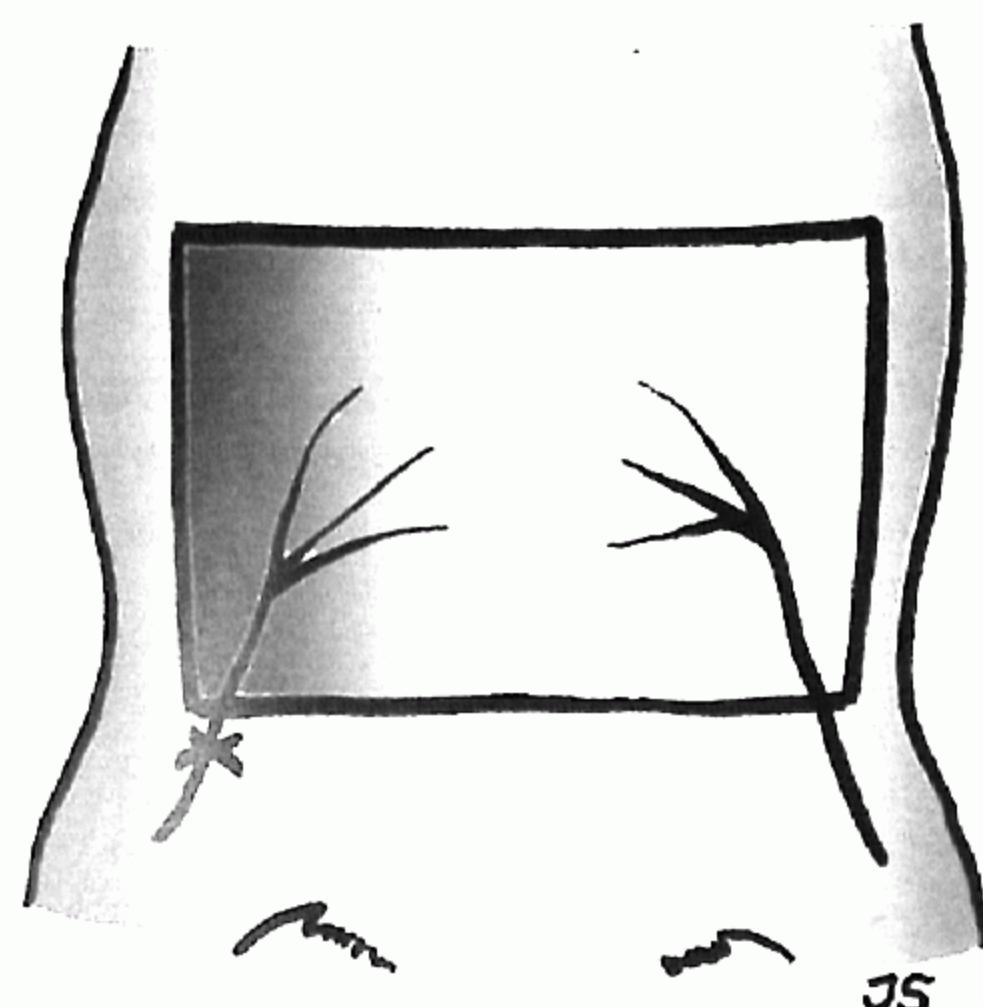


Fig. 1. Schematic diagram of the skin flaps supplied by only the left epigastric artery.

로 생존부위의 관찰이 어느 정도 용이한 7일, 14일에 관찰하였고, Visitrak digital[®](Smith & Nephew, London, UK)로 생존 면적을 측정하여 전체 면적에 대한 비율로 피판 생존율을 구하였다(Fig. 2). 오차를 줄이기 위해 같은 조직을 세 번씩 측정하여 평균값을 산정하였다.

마. 조직학적 염색

피판을 생검하여 4°C에서 4% paraformaldehyde로 24시간 고정한 후 흐르는 물에 수세한 다음 파라핀으로 포매하여 조직을 5 μm 두께로 박절하였다. 박절한 조직을 코팅 슬라이드 위에 붙인 다음 xylene으로 파라핀을 제거하고 계열 알코올 순(100% - 95% - 90% - 80% - 70% - EtOH)으로 함수 과정을 거친 후 Harris's hematoxylin 염색액으로 2분간 염색한 후 흐르는 물에 5분간 수세하고 1% HCl-alcohol과 ammonia 용액으로 탈염색하였다. 이후 흐르는 물에 10분간 수세한 후 다시 eosin 염색액으로 2분간 대조 염색하고 함수의 역방향으로 탈수(dehydration)과정을 거친 후 봉입하여 현미경(× 200)으로 관찰하였다.

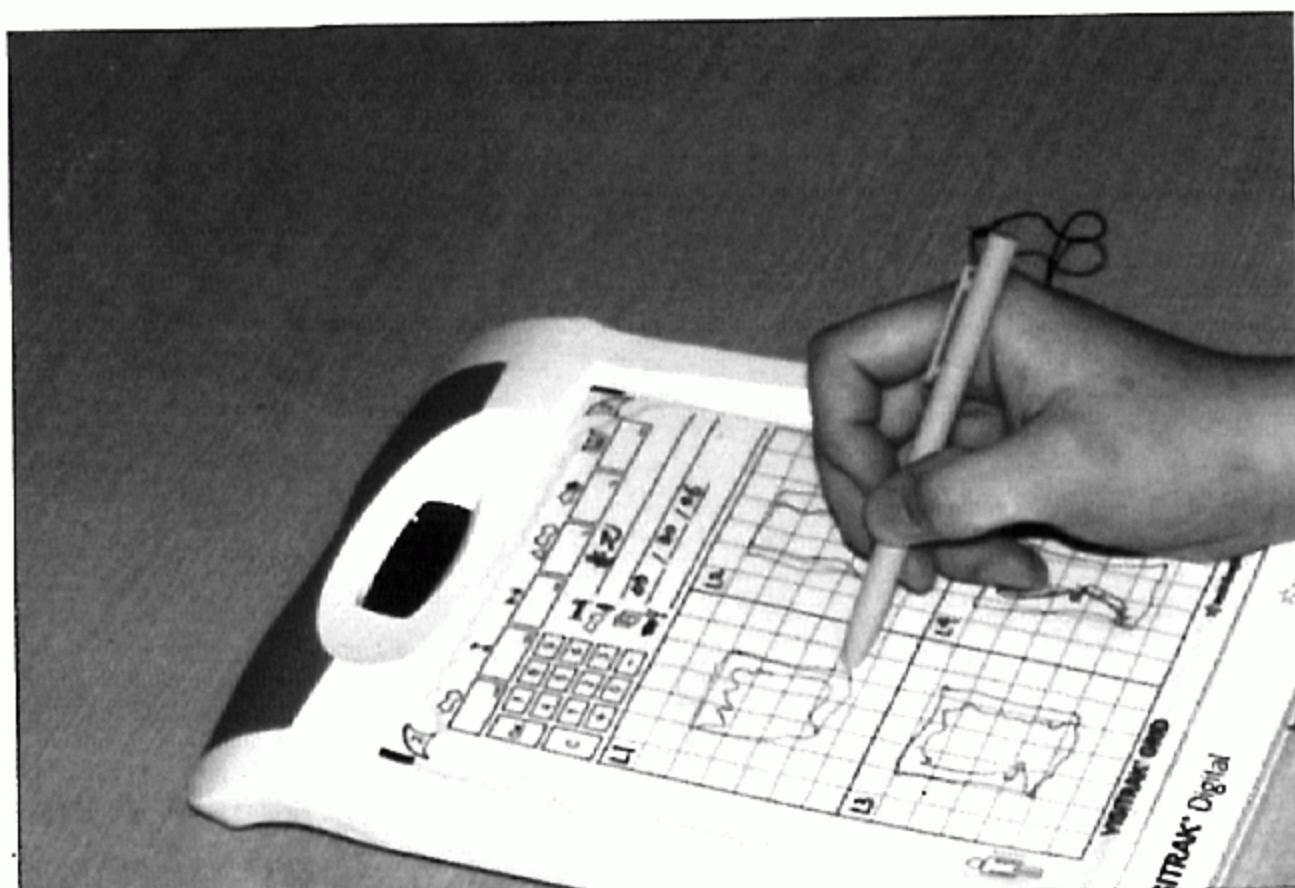


Fig. 2. Visitrak digital[®].

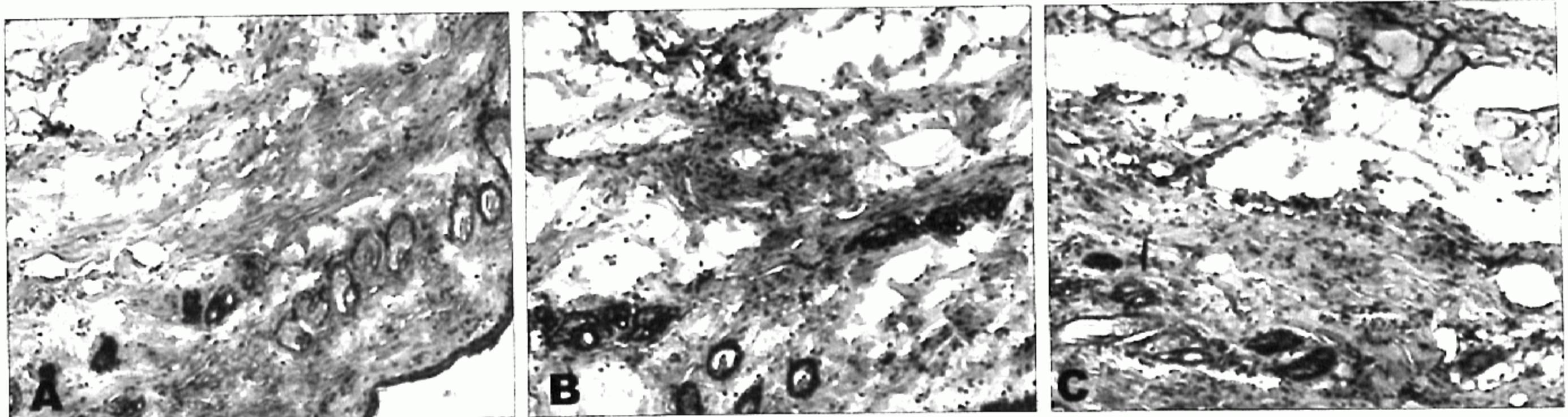


Fig. 3. Detection of flag-VEGF and flag-COMP-Ang1(Immunohistochemical staining, × 200). Flag negative staining of a control skin flap (Left) and the brown color of the positive staining with adenovirus VEGF (Center) and COMP-Ang1 (Right) treated flap.

바. 동결절편에서의 면역조직화학염색

생검한 피판을 O.C.T. compound(SAKURA, USA)와 함께 -20°C에서 동결건조 시킨 후, 7 μm 두께로 잘라서 슬라이드에 붙인 다음 4% paraformaldehyde로 고정시켰다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소수 용액에서 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.01 M 인산염 완충액에서 10분간 세척하였다. CD31 (CHEMICON, USA) 항체를 37°C에서 반응시킨 후 DAB로 발색하고 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

사. 미세혈관 형성의 평가

염색된 슬라이드를 저배율에서 관찰하여 면역반응 양성인 혈관이 가장 많이 존재하는 부위를 선택한 후, 200배 배율에서 혈관수를 조사하였다. 이때 혈관 직경이 적혈구 직경의 8배가 넘거나 두꺼운 균육층을 가지고 있는 혈관은 계산에서 제외하였으며, 내강의 형성여부에 관계없이 한 개 이상의 혈관내피세포로 이루어진 혈관도 모두 계산하였다. 3개의 시야를 조사한 후 평균값을 미세혈관 수로 산정하였다.

아. 자료 처리 및 통계학적 분석

실험결과는 SPSS 12.0을 사용하였으며 집단 간 비교는 ANOVA를 통해 분석하였고, 비모수적 방법인 Mann-Whitney Test를 실시하였다. 측정한 각각의 자료는 평균과 표준 오차로 표시하였고, $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

가. 아데노바이러스의 발현 확인

Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1이 발현하는지를 조사하

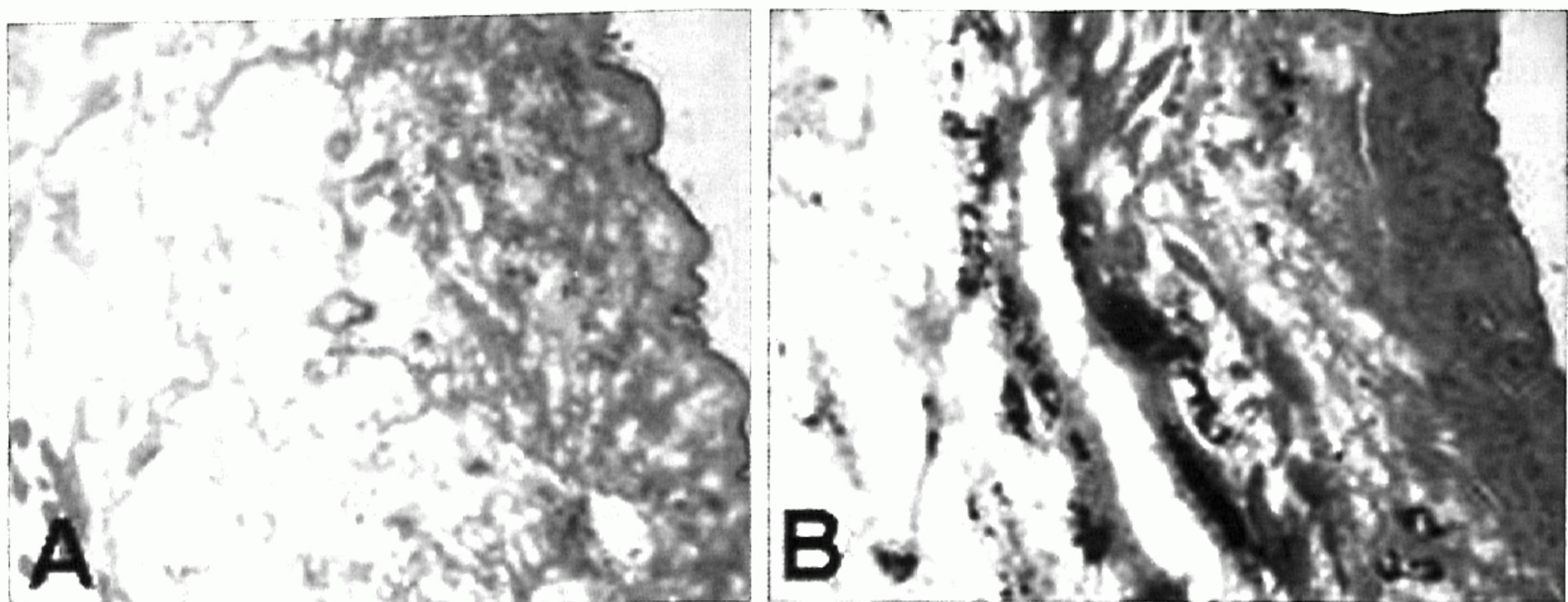


Fig. 4. Detection of adenovirus Lac Z(X-gal staining, $\times 200$). Lac Z staining of a control skin flap (Left), and the blue color of the positive staining with the adenovirus Lac Z (Right) treated flap.

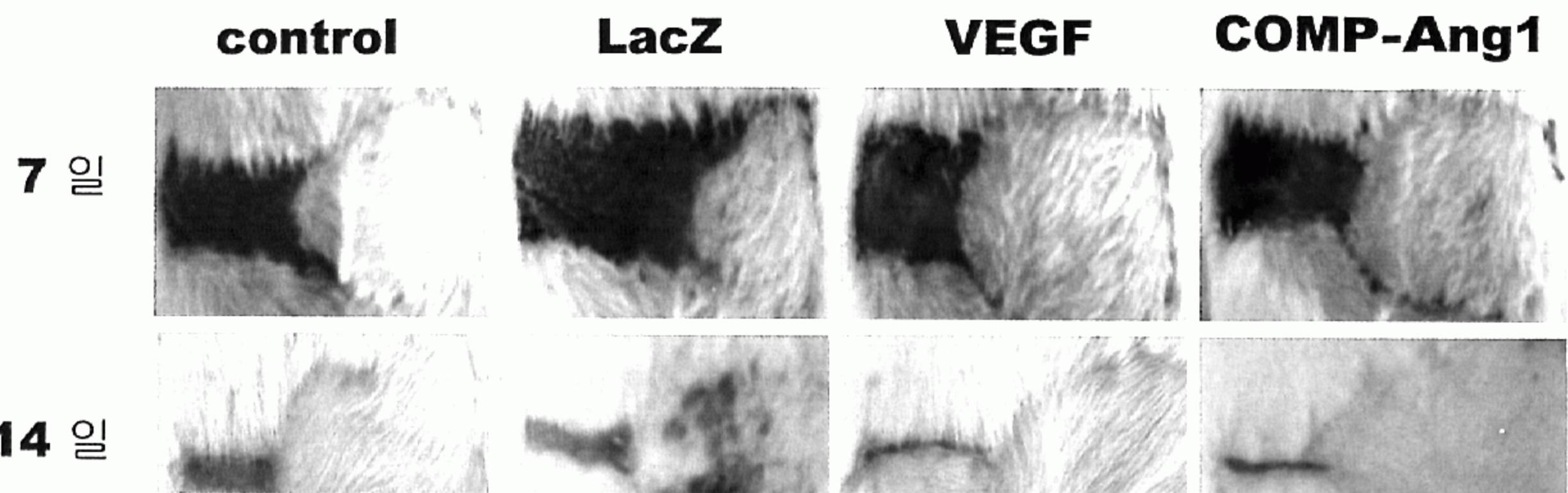


Fig. 5. A comparison of epigastric skin flap viability at 7 and 14 days after treatment, showing increased survival of the flaps in the adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

기 위해 동결건조에서의 면역조직학적 염색을 flag antibody(SIGMA, USA)로 실시한 결과 실험군에서는 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1이 발현된 반면 대조군에서는 발현하지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3). Ad-Lac Z를 통해 투여가 잘 되는지를 확인하기 위해 X-gal 염색을 통해 확인한 결과 대조군에 비해 염색이 나타났으므로 투여방법이 적절하다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

나. 육안적 관찰 및 생존면적

아데노바이러스 투여 후 7일째에 Ad-VEGF, Ad-COMP-Ang1, 그리고 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 함께 투여한 군에서 피부피판의 생존면적은 각각 89.85 ± 11.9 ($p < 0.021$), 91.11 ± 1.8 ($p < 0.021$), 94.84 ± 2.5 ($p < 0.021$)로 나타났다. 14일째에는 각각 95.65 ± 0.7 ($p < 0.021$), 94.83 ± 1.9 , 96.39 ± 1.7 ($p < 0.021$)로 관찰되었다(Fig. 5). 7일째와 14일째에 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 함께 투여한 군에서 생존면적이 더 높아졌다. 전체적으로 보았을 때 7

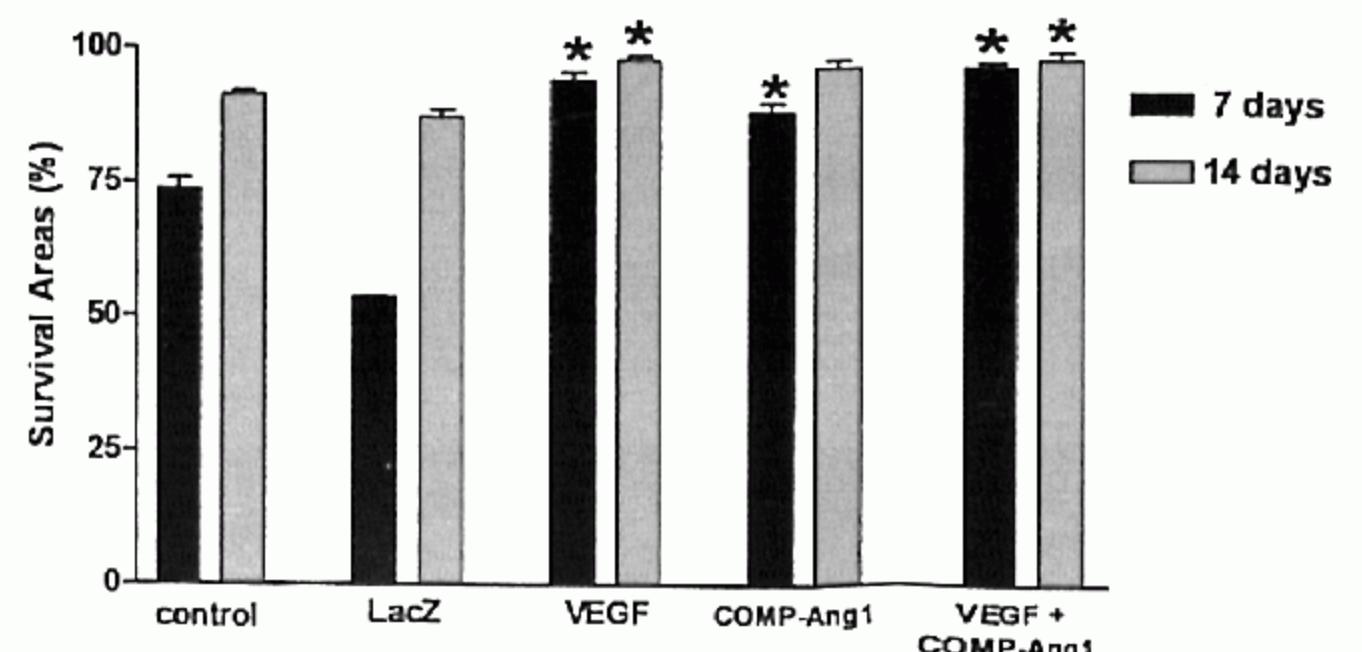


Fig. 6. A comparison of the values for the mean percent area of flap survival among the different groups. Adeno-virus VEGF and COMP-Ang1 treated vs. Lac Z, $p^* < 0.05$

일째에 생존면적의 증가가 두드러지게 나타났다(Fig. 6).

다. 조직학적 소견 및 모세혈관의 수 관찰

Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 투여한 군과 대조군의 피판을 적출하여 H&E 염색을 실시한 결과 대조군에 비해

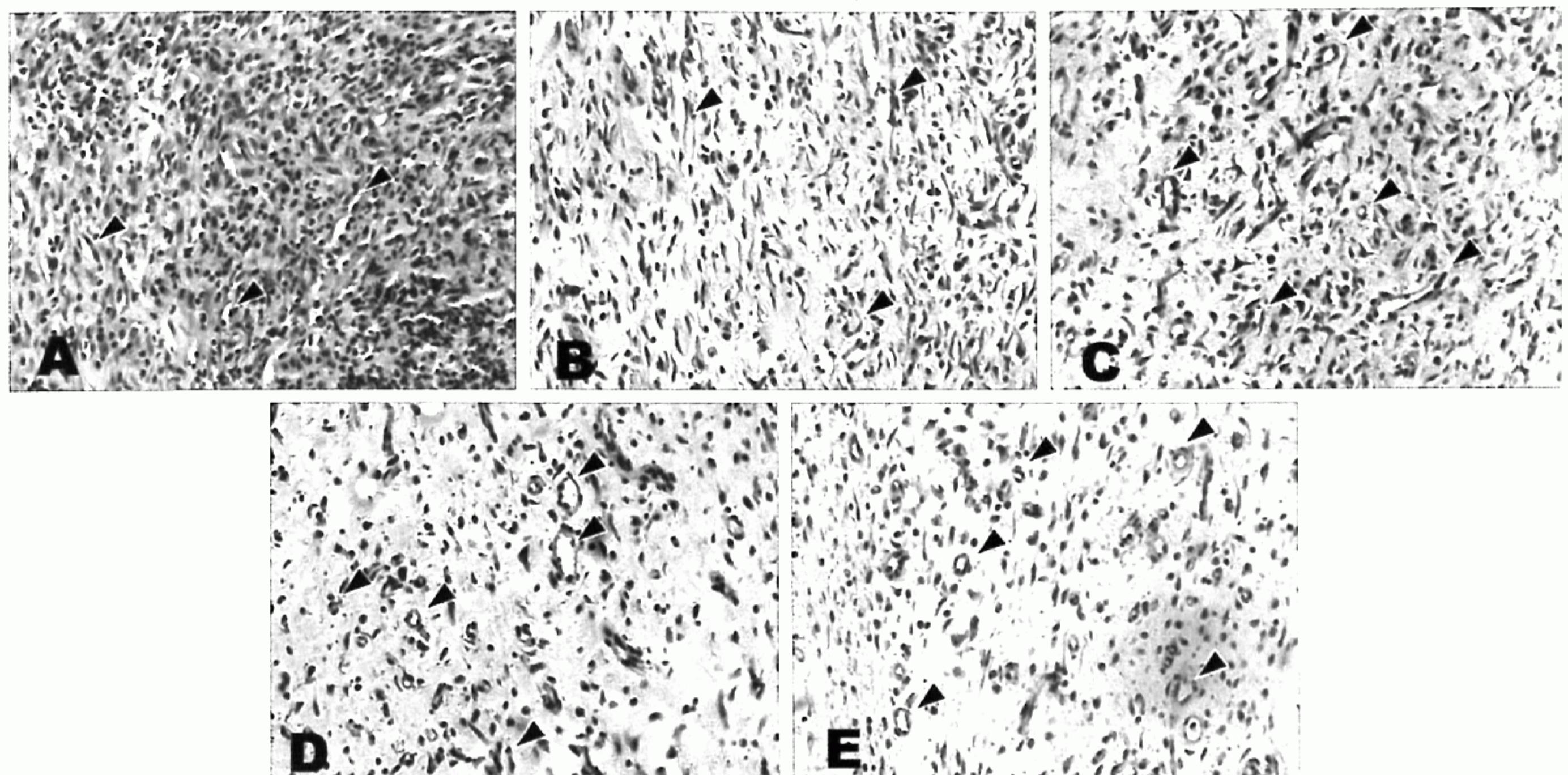


Fig. 7. Effect of adenovirus VEGF and COMP-Ang1 on vascular remodeling of the skin flaps at 3 days after treatment (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$) (Above, left) control, (Above, center) Lac Z, (Above, right) adenovirus VEGF, (Below, left) adenovirus COMP-Ang1, and (Below, right) adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

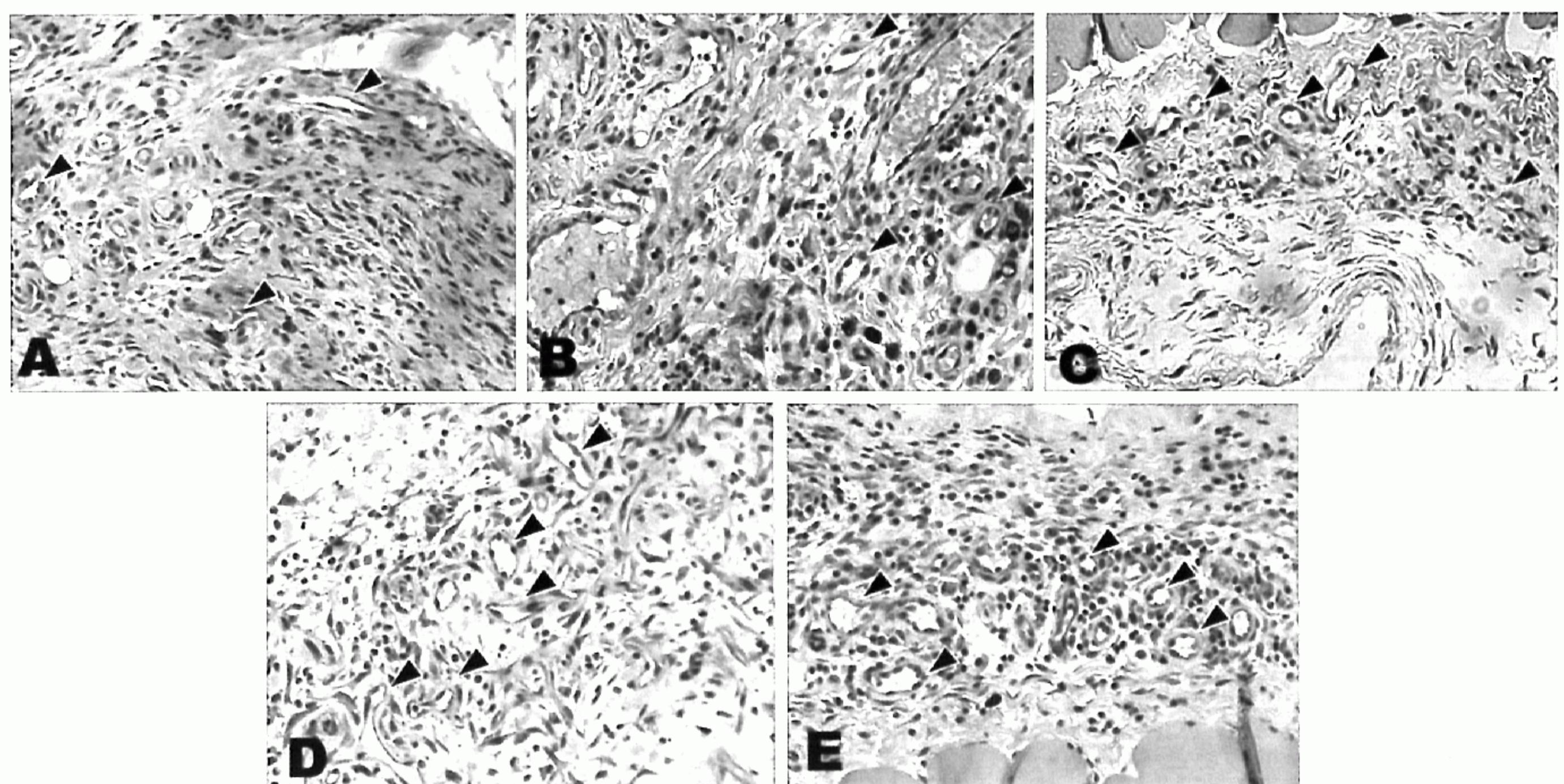


Fig. 8. Effect of adenovirus VEGF and COMP-Ang1 on vascular remodeling of the skin flaps at 7 days after treatment (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$). (Above, left) control, (Above, center) Lac Z, (Above, right) adenovirus VEGF, (Below, left) adenovirus COMP-Ang1, and (Below, right) adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

더 많은 혈관이 관찰되었다. 200배율에서 모세혈관의 수를 측정하였을 때 3일째에 Ad-VEGF, Ad-COMP-Ang1, 그리고 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 함께 투여한 군에서 각각 $21.5 \pm 4.2(p < 0.04)$, $22.08 \pm 4.3(p < 0.021)$, 16.3

± 0.8 로 나타났다(Fig. 7). 7일째에는 각각 $25.3 \pm 2.0(p < 0.021)$, $25.0 \pm 4.1(p < 0.021)$, $23.7 \pm 3.4(p < 0.021)$ (Fig. 8), 14일째에는 각각 $23.1 \pm 1.9(p < 0.021)$, $30.8 \pm 5.2(p < 0.021)$, $31.2 \pm 4.1(p < 0.021)$ 로 관찰되었다(Fig. 9). 대조군

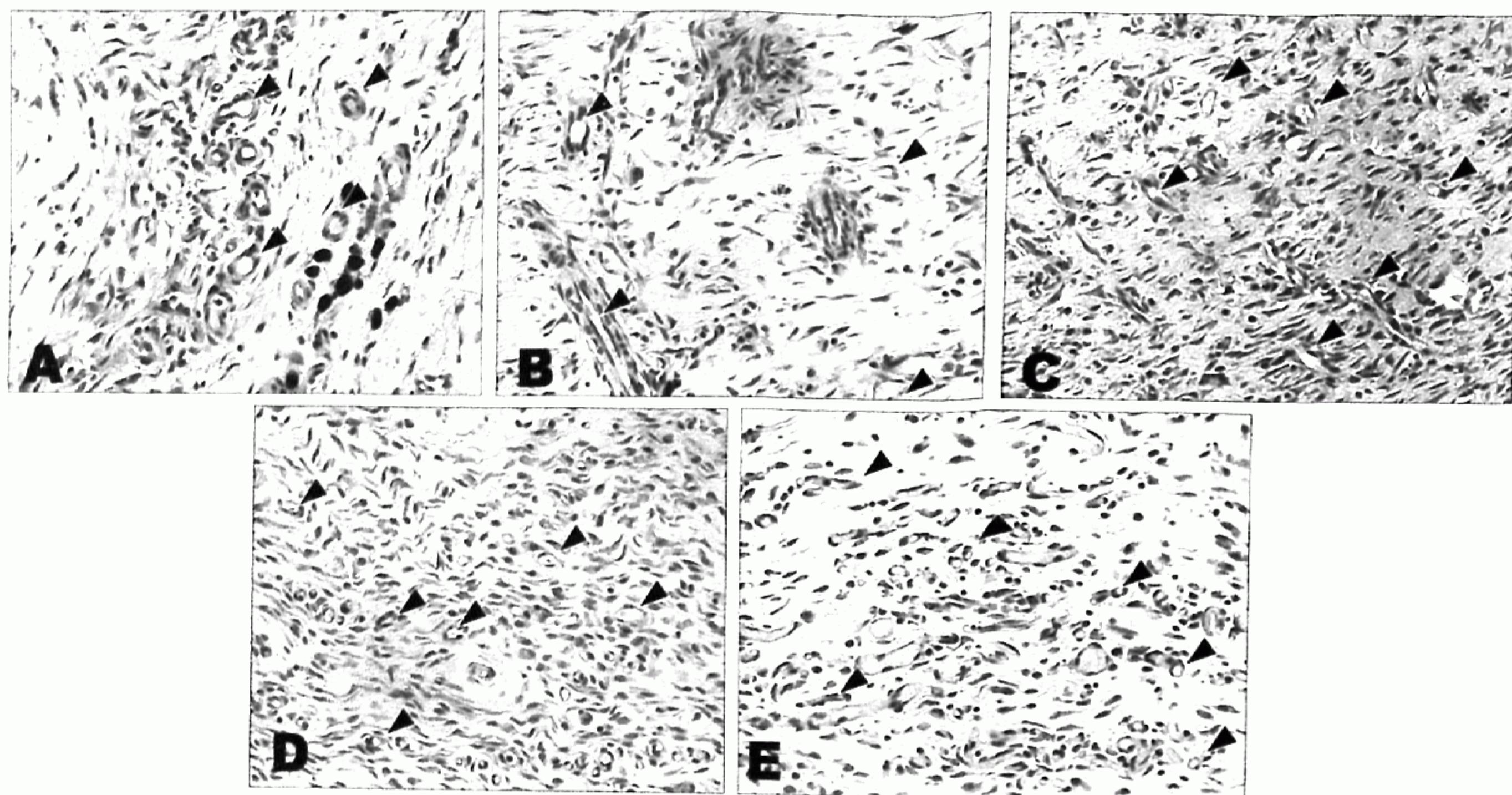


Fig. 9. Effect of adenovirus VEGF and COMP-Ang1 on vascular remodeling of the skin flaps at 14 days after treatment (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$). (Above, left) control, (Above, center) Lac Z, (Above, right) adenovirus VEGF, (Below, left) adenovirus COMP-Ang1, and (Below, right) adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

Table I. Number of Capillaries per Field in the Skin Flap

	Control	Ad-Lac Z	Ad-VEGF	Ad-COMP-Ang1	Ad-VEGF + Ad-COMP-Ang1
3 days	13.20 \pm 1.26	13.25 \pm 3.41	21.55 \pm 4.20*	22.08 \pm 4.33*	16.33 \pm 0.81
7 days	14.33 \pm 2.32	13.25 \pm 0.87	25.33 \pm 2.07*	25.08 \pm 4.10*	23.75 \pm 3.47*
14 days	12.83 \pm 2.51	15.33 \pm 3.34	23.17 \pm 1.93*	30.83 \pm 5.20*	31.25 \pm 4.16*

* $p < 0.05$ vs Lac Z; VEGF, vascular endothelial growth factor; COMP-Ang1, cartilage oligomeric matrix protein-Angiopoietin1; Ad, adenovirus.

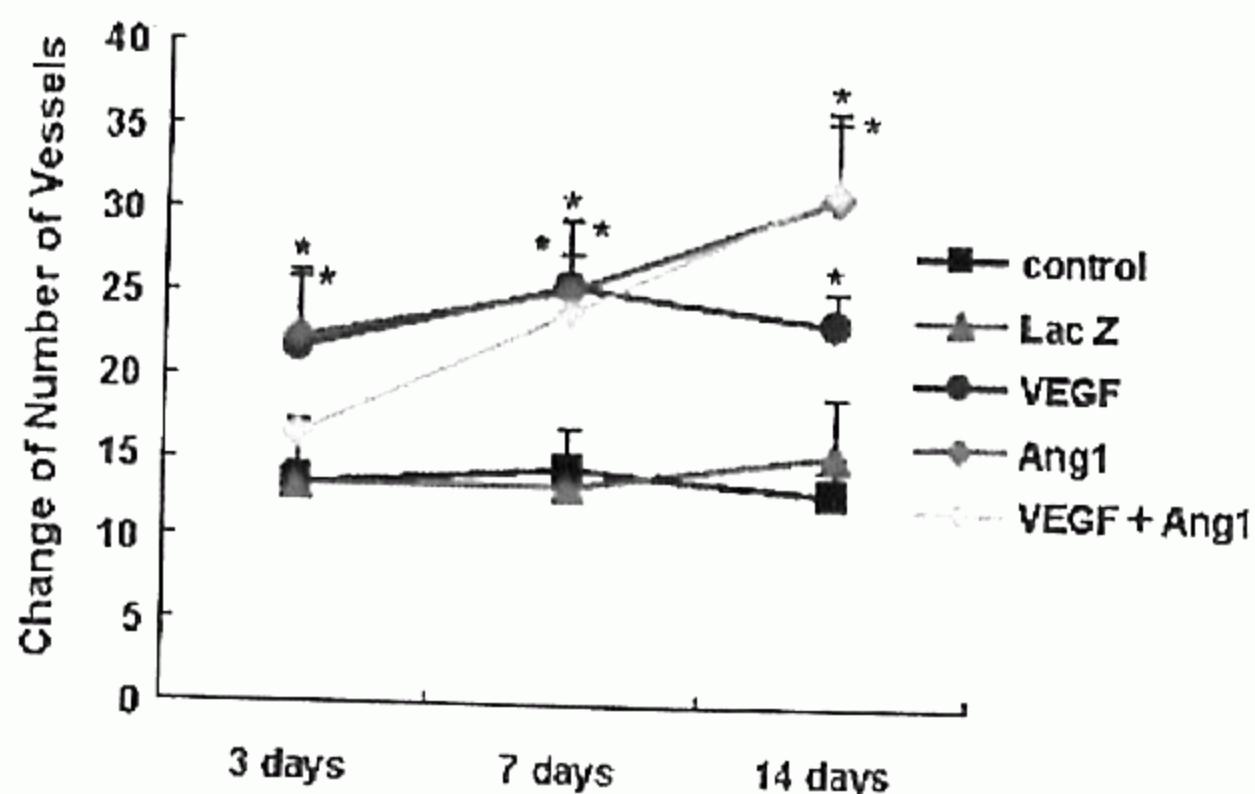


Fig. 10. Comparison of the number of capillaries per high power field magnification.

라 혈관의 수가 더 증가하였다(Fig. 10, Table I). 14일째에 있어서 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 각각 투여한 군보다 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 함께 투여한 군에서 혈관의 수가 더 증가하였다.

라. 동결절편에서의 면역조직화학적 관찰소견

Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 투여한 군과 대조군의 피판조직을 동결건조시켜 혈관내피세포 표지인 CD 31을 관찰한 결과 항체가 침가되지 않은 음성 대조군에서는 발현되지 않는 것을 확인하였고, 실험군에서는 대조군에 비해 CD31의 발현이 증가한 것을 볼 수 있었다. 3일, 7일, 14일째 시간이 지남에 따라 CD31이 많이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 11-13).

과 비교하였을 때 의미있게 증가하였고, 시간이 지남에 따

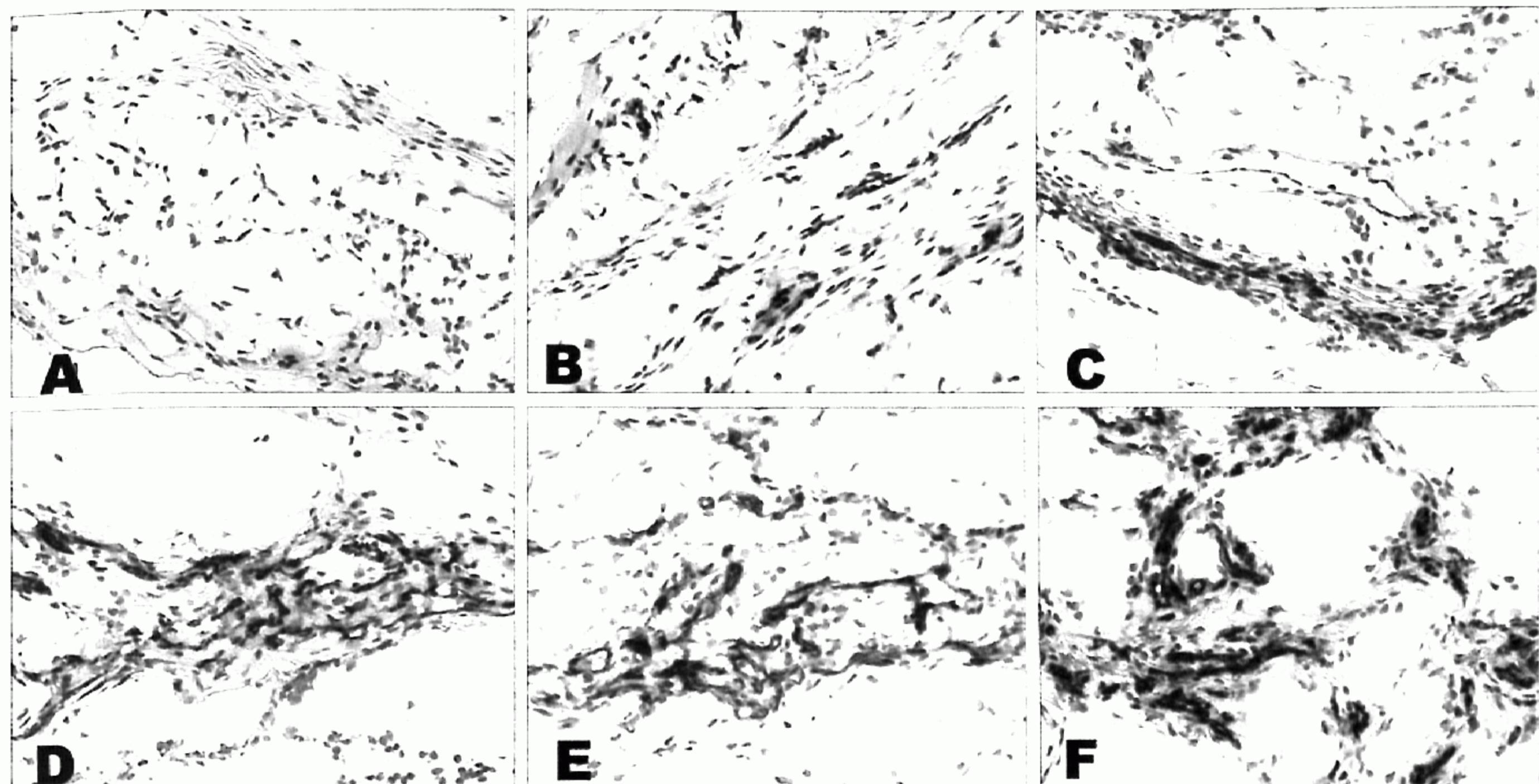


Fig. 11. Immunohistochemical analysis of the adenovirus VEGF and COMP-Ang1 of CD31 expression in the flaps at 3 days after treatment. (Above, left) Negative control, (Above, center) control, (Above, right) Lac Z, (Below, left) adenovirus VEGF, (Below, center) adenovirus COMP-Ang1, and (Below, right) adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

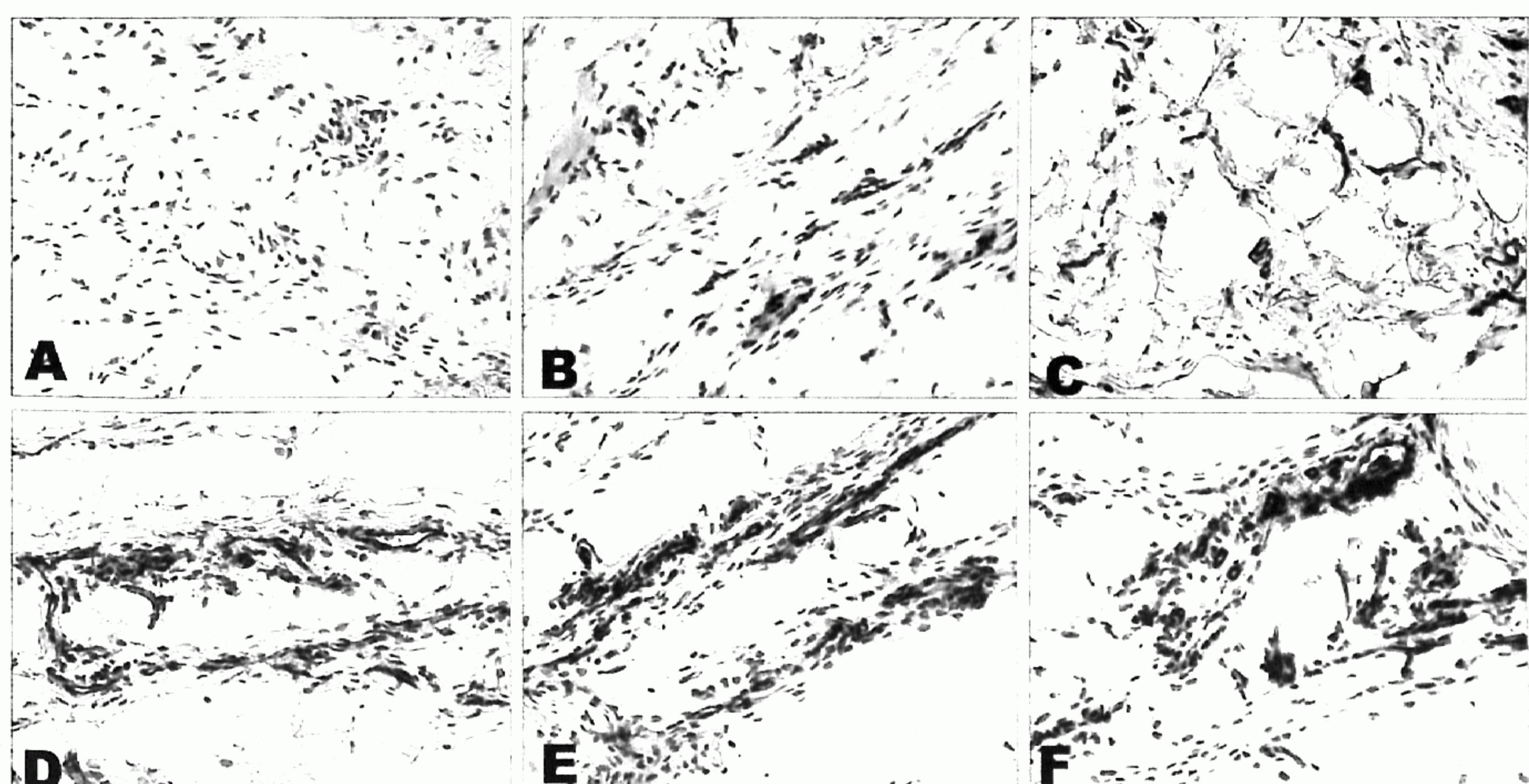


Fig. 12. Immunohistochemical analysis of the adenoviral VEGF and COMP-Ang1 of CD31 expression in the flaps at 7 days after treatment(Above, left) Negative control, (Above, center) control, (Above, right) Lac Z, (Below, left) adenovirus VEGF, (Above, center) adenovirus COMP-Ang1, and (Below, right) adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

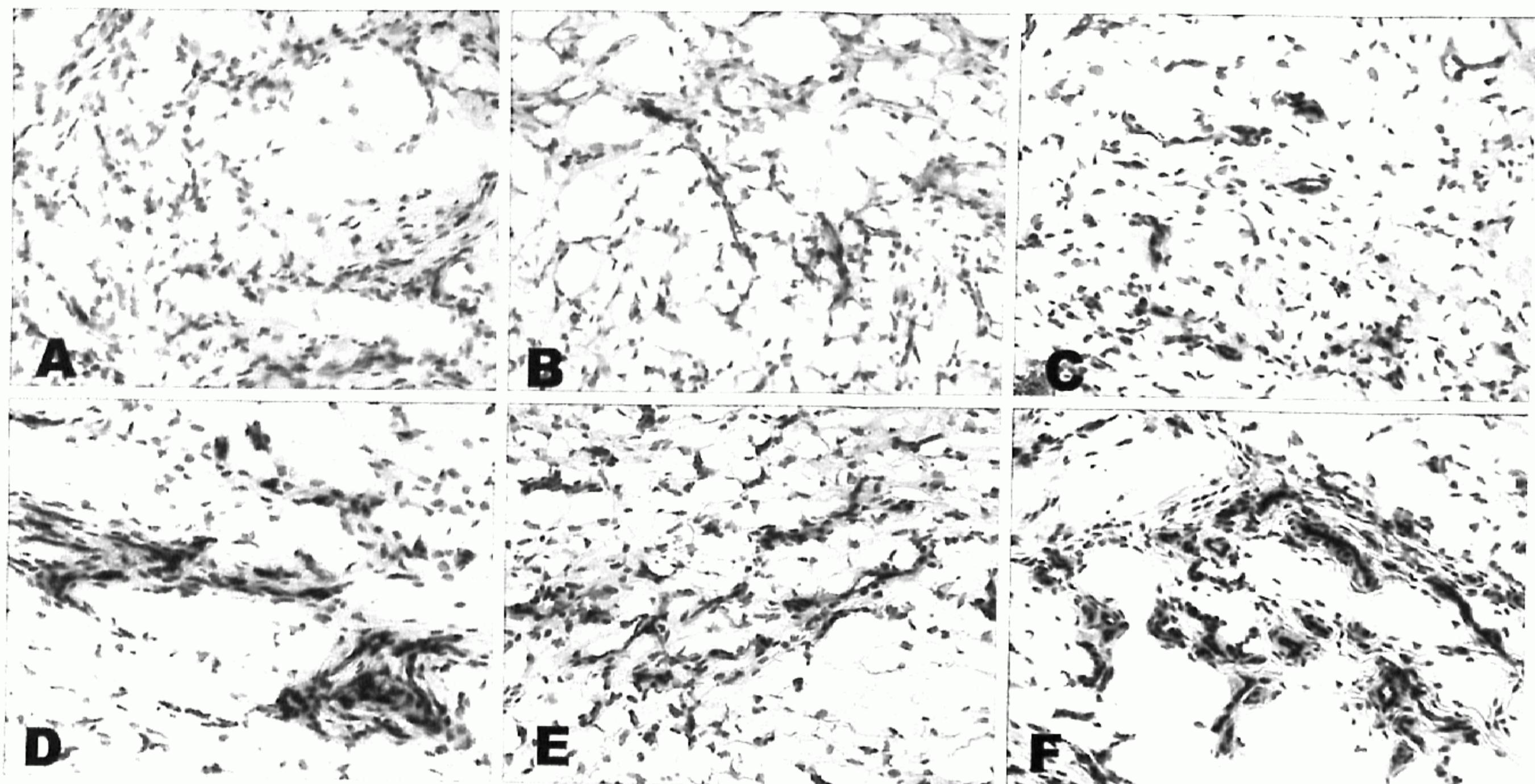


Fig. 13. Immunohistochemical analysis of the adenoviral VEGF and COMP-Ang1 of CD31 expression in the flaps at 14 days after treatment. (Above, left) Negative control, (Above, center) control, (Above, right) Lac Z, (Below, left) adenovirus VEGF, (Below, center) adenovirus COMP-Ang1, and (Below, right) adenovirus VEGF and COMP-Ang1 treated groups.

IV. 고 찰

저자들이 백서의 아래쪽 배벽동맥을 혈관경으로 하는 피부피판에 DNA를 통한 유전자 전달방법의 한계를 극복하기 위해 전달 효율이 높은 아데노바이러스를 이용하여 VEGF와 COMP-Ang1 유전자를 각각 그리고 함께 전달하였을 때 모두 혈관신생을 유도하여 혈관의 수가 증가하였고, 피판의 생존면적이 증가한 것을 확인하였다.

혈관신생(angiogenesis)은 기존에 존재하는 혈관에서부터 혈관내피세포의 이동, 증식, 분화, 그리고 기질단백질 분해 등을 통해 새로운 혈관이 형성되는 과정을 말한다. 반면 신생혈관증식(neovascularization)은 배아발생초기에 중배엽 전구물질로부터 혈관이 형성되는 것을 말한다. 혈관신생에 있어 가장 강력한 성장인자인 VEGF를 직접 투여하여 피판의 생존을 향상시키는^{6,8} 긍정적인 결과들을 바탕으로 유전자 치료를 통하여 VEGF 성장인자를 지속적으로 증가시키고자 하는 연구들이^{9,10} 최근 진행되고 있다.

유전자 치료는 비 바이러스성 유전자 치료(nonviral gene therapy)와 바이러스성 유전자 치료(viral-based gene therapy)로 나눌 수 있다. 비 바이러스성 유전자 치료방법은 1) DNA plasmid를 직접 조직에 주사하거나, 2) DNA를 phospholipoid capsule에 싸서 넣어주는

liposome technique, 3) Pulsed electric wave로 형질막(plasma membrane)에 구멍을 뚫어 DNA의 확산을 증가시키는 electroporation, 4) Gene gun technique 등이 있다.¹¹ 이러한 다양한 방법들이 고안되었지만 목적하는 유전자를 세포내의 유전체에 효과적으로 합체(incorporation)시키는 데는 한계가 있었다. 이에 반해 바이러스성 유전자 치료는 유전자 전달률(transfection rate)과 지속성이 높은 장점이 있다. 유전자 전달에 이용되는 바이러스는 adenovirus, retrovirus, adeno-associated virus, 그리고 herpes virus 등이 있다.

저자들이 이용한 아데노바이러스는 목적유전자가 표적 세포내의 유전체에 안전하게 결합되는 것이 아니고 염색체 밖에 일시적으로 존재하여 transgene expression을 유발하여 필요한 단백질을 생성하기 때문에 목적유전자가 영구적으로 합체되는 retrovirus에 비해 "insertional mutagenesis"의 위험과 부작용이 적어서 임상적으로 사용가능성이 높다.¹² 특히, 성형외과 영역에서 피판의 허혈을 개선하거나 피부상처치유 개선의 목적으로 이용될 경우에는 단기간의 효과만으로도 필요한 목적을 이룰 수 있기 때문에 더 효용가치가 크다고 생각된다.

Ang1은 혈관의 성숙(maturation)과 안정(stabilization) 그리고 재형성(remodeling)에 관여하지만 혈관내피세포의 분열증식을 유도하지는 않는다고 한다.⁷ Jung 등¹⁰은 Ang1을 아데노바이러스를 이용하여 유전자 치료하였을

때 피부피판의 생존이 대조군에 비해 20% 이상 증가한 것을 보고한 바가 있다. COMP-Ang1은 Ang1의 amino-terminal 부분을 COMP로 대체한 변형체로 Ang1보다 더 안정적이고 Tie2 receptor 인산화에 더 강력하게 작용한다고 한다.¹³ Cho 등¹⁴은 2주 동안 adenoviral vector를 이용하여 COMP-Ang1을 계속 투여하여 혈관생성 정도를 관찰한 결과 지속적인 혈관의 확대와 혈류의 증가를 확인하였다.

혈관신생에 중요하게 작용하는 VEGF와 Ang1을 동시에 투여함으로써 상승효과를 얻으려는 착상이 자연스럽게 연구로 이어졌다. Chae 등¹⁵은 토끼의 하지 혀혈모델에서 VEGF와 COMP-Ang1유전자를 세포에 전달하고 혈관을 관찰한 결과 대조군에 비해 VEGF와 COMP-Ang1을 각각 전달한 군에서 혈관의 수가 더 증가하였고, VEGF와 COMP-Ang1을 함께 전달한 군에서는 현저한 증가를 확인하였다. 저자들의 결과에서는 7일째와 14일째에 VEGF와 COMP-Ang1을 함께 전달한 군에서 생존면적이 더 늘어났다. 혈관의 수는 VEGF와 COMP-Ang1을 각각 투여한 군에서는 3일 째부터 의미 있게 증가하였지만 VEGF와 COMP-Ang1을 함께 투여한 군은 7일을 지나서 의미 있게 증가하였고, 14일째에는 VEGF와 COMP-Ang1을 각각 투여한 군보다 함께 투여한 군에서 혈관의 수가 더 증가하였다.

Giunta 등⁹은 *in vitro*에서 adenovirus VEGF165의 발현이 최고에 이르는 데는 약 48시간이 소요된다고 하였고, 동물실험에서도 수술 3, 7일 전에 투여하였을 때 피판의 생존면적이 의미 있게 증가하였다고 하였다. 저자들의 연구에서 7일째부터 의미 있는 결과가 나온 이유도 이와 같은 발현시간과 연관이 있을 것으로 생각된다.

임상에서 유전자치료를 도입하여 필요한 시점에 피판의 혈류를 최대한 높이기 위해서는 투여시기와 주사방법에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

백서의 아래쪽배벽동맥을 혈관경으로 하는 피부피판에 Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1를 각각 그리고 함께 주사하고, 3, 7, 14일째 백서를 희생시켜 피판의 생존면적을 측정하고, 피판을 적출하여 면역조직화학적 염색과 혈관 수의 변화를 관찰하였다. 생존 면적은 대조군에 비하여 유전자 전달군에서 증가하였고, 면역조직화학적 염색 결과에서도 유전자 전달군에서 혈관의 수가 더 증가하였다. 혈관내피세포 표지인 CD31에 대한 면역조직화학적 염색 결과 유전자 전달군에서 CD31이 많이 발현하-

였다. Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 이용한 유전자치료는 혈관의 생성을 유도하여 효과적으로 피부피판의 생존을 높였고, Ad-VEGF와 Ad-COMP-Ang1을 함께 투여하였을 때 더 효과가 좋은 것을 확인하였다.

REFERENCES

- Taylor GI, Gorlett RJ, Caddy CM, Zelt RG: An anatomical review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 89: 408, 1992
- Codner MA, Bostwick J 3rd: The delayed TRAM flap. *Clin Plast Surg* 25: 183, 1998
- Finseth F, Zimmermann J, Liggins D: Prevention of muscle necrosis in an experimental neurovascular island muscle flap by a vasodilator drug-isoxsuprime. *Plast Reconstr Surg* 63: 774, 1979
- Goshen J, Wexler MR, Peled IJ: The use of two alpha blocking agents, phenoxybenzamine and phentolamine, in ointment and injection form to improve skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg* 15: 431, 1985
- Kim SS, Byeon JH, Yoo G, Han KT: The effect of Lipo-PGE1 according to the routes of administration on the survival of transverse rectus abdominis musculocutaneous flap in rats. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 12, 2005
- Seify H, Bulky U, Jones G: Effect of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis on TRAM flap harvesting after abdominoplasty. *Plast Reconstr Surg* 111: 1212, 2003
- Koh Gy: Angiogenic Factors and Their Receptors. *J Korean Soc Endocrinol* 16: 277, 2001
- 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: 1219, 2004
- Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Biemer E, Gansbacher B: AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J Gene Med* 7: 297, 2005
- Jung H, Gurunluoglu R, Scharpf J, Siemionow M: Adenovirus-mediated angiopoietin-1 gene therapy enhances skin flap survival. *Microsurgery* 23: 374, 2003
- Jenkins DD, Yang GP, Lorenz HP, Longaker MT, Sylvester KG: Tissue engineering and regenerative medicine. *Clin Plast Surg* 30: 581, 2003
- Yla-Herttuala S, Martin JF: Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 355: 213, 2000
- Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Yasunaga K, Kim KT, Choi HH, Kim W, Kim SH, Park SK, Lee GM, Koh GY: Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5553, 2004
- Cho CH, Kim KE, Byun J, Jang HS, Kim DK, Baluk P, Baffert F, Lee GM, Mochizuki N, Kim J, Jeon BH, McDonald DM, Koh GY: Long-Term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlarge-

ment and enhanced blood flow. *Circ Res* 97: 86, 2005
15. Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY: Coadministration of angiopoie-

tin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2573, 2000