



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학박사 학위논문

랫드 공장 피판으로의 혈관 신생에
장막이 미치는 영향

The effect of serosa on neovascularization in
rat jejunal flap model

울산대학교 대학원

의학과

이광

랫드 공장 피판으로의 혈관 신생에
장막이 미치는 영향

지도교수 김은기

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2020년 8월

울산대학교 대학원

의학과

이광

이광의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원 홍준표 인

심사위원 엄진섭 인

심사위원 김은기 인

심사위원 서현석 인

심사위원 김규남 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2020년 8월

국 문 요 약

공장 피관 이식술은 임상에서 하인두 및 식도 재건의 한가지 방법으로서는 합리적인 성공률과 기능적인 역할을 하는 피관으로 많이 사용되어 왔다. ^{1,2,3,4,5,6,7}

보통 다른 근육 피관들은 이식 후 일정 기간이 지나면 수혜부로부터 혈관이 자라나 피관경(pedicle)의 개통 여부와 상관없이 생존하지만, 공장 피관은 이와 달리 외경이 장막(serosa)으로 둘러싸여 있어 혈관의 신생 양상이 다른 피관과 차이가 있다는 가설들이 있어 왔다. ^{8,9,10}

장막은 2가지 층으로 구성되어 있고, 콜라겐과 상피세포층으로서 본래 윤희성의 액체를 분비하여 장의 유착을 방지하고 마찰을 감소시키는 역할을 한다. 이것은 심장을 둘러싸는 막, 폐를 둘러싸는 막처럼 주변 장기로부터 마찰을 최소화 시켜주는 역할을 한다.

이 장막이 피관으로의 혈관 신생을 저해하여 다른 피관과 달리 피관경에 의존하는 시기가 연장될 것이라는 가설이 있다. ⁸ 실제로 다수 논문에 피관의 주변 혈관 신생의 척도인 혈관경(pedicle)을 분할(division)해도 생존할 수 있는 시기가, 유리 공장 피관의 경우 다른 근육 피관이나 근막-피부 피관, 골 피관에 비하여 느리다고 보고된 문헌이 있다.

따라서, 이번 연구에서는 다음과 같은 3가지 가설을 세우고 연구를 진행하였다.

가설1. 공장 피판과 근육 피판을 비교하였을 때, 이 두 그룹 간의 혈관 신생에 차이가 있다. 즉 공장 피판의 혈관 신생이 상대적으로 더 늦다.

가설2. 공장에서 장막을 부분적으로 제거하면 그렇지 않은 공장 피판에 비해 혈관 재생성이 빠르다.

가설3. 공장 피판의 장막을 제거하면 혈관 신생은 근육 피판과 대등한 수준으로 증가한다.

실험은 8주령 300g의 Sprague-Dawley종 랫드를 대상으로 실험을 시행 하였다. 총 18마리를 6마리씩 3개의 그룹으로 나누어서 실험하였다.

Group 1, (n=6, 이하 모두 동일) 장막(serosa)을 제거하지 않고 이식한 군, **Group 2** 장막(serosa)을 제거하고 이식한 군, **Group 3(대조군)** 복직근에 1x1cm² 크기로 복직근막을 제거한 군으로 실험을 진행했다.

1,2 주차에 채취한 피부-근육 전층 절편을, CD31, PAS, MT, VEGF, α-SMA 총 다섯 가지 면역화학염색을 시행하여 공장 피판 및 근육 피판 주변으로 혈관 신생 정도(neovascularization)와 공장 피판의 관류량(perfusion) 정도 및 섬유화(fibrosis), 상처 복구(wound repair) 정도 등을 정량화하여 평가하였다.

그 결과 공장 피판과 근육 피판 (Group 1, 3)을 비교하였을 때, 공장 피판의 주변 조직과의 혈관 신생 및 섬유화, 상처 복구 정도가 근육 피판에 비해 더 낮게 나타났음을 알 수 있었다. 공장 피판과 장막 제거 공장 피판 (Group 1, 2)을 비교하였을 때, 장막을 제거한 이식 피판에서 공장의 생착 정도가 더욱 양호 하였다. 장막 제거 공장 피판과 근육 피판 (Group 2, 3)을 비교하였을 때, 공장의 장막을 제거하였음에도 근육 피판보다 혈관 신생 및 섬유화, 상처 복구 정도가 근육 피판에 비해 더 낮음을 알 수 있었다.

이를 토대로 공장 피판이 다른 피판과 다른 점으로, 피판을 둘러싸는 장막(serosa)이 있어서 주변 혈관신생(neovascularization)에 방해물로서 영향이 있음을 파악하였다. 그러나 장막 제거 피판과 근육 피판을 비교하였을 때, 그 생착률에서 근육 피판보다는 떨어짐을 보였다. 이는 여러가지 이유가 있고, 한 가지 이유로는 장막을 온전히 전부 제거하지 않은 점에서 영향이 있다고 생각된다.

이번 실험을 토대로 추후 실제 임상에서 장막(serosa)을 제거 후 이전하거나 혹은 장막(serosa)의 영향을 숙지하고 이에 다른 처리를 통해, 피판의 빠르고 안전한 생착에 더 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 장막이 물리적으로 영향을 끼치는지, 분자 화학적으로 분비하는 물질에서 영향을 끼치는지에 대해서는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

차 례

국문요약.....	i
차례.....	iv
표차례.....	v
그림차례.....	vii
약어정리.....	x
서론.....	1
연구재료 및 방법.....	4
결과.....	15
고찰.....	55
참고문헌.....	60
영문요약.....	64

표 차례

표 1. 실험군의 구성.....	5
표 2. 7일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개.....	16
표 3. 14일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수.....	16
표 4. 7일째 Group 1,3의 MT 염색 후 fibrosis density.....	19
표 5. 14일째 Group 1,3의 MT 염색 후 fibrosis density.....	19
표 6. 7일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density.....	22
표 7. 14일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density.....	22
표 8. 7일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density.....	25
표 9. 14일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density.....	25
표 10. 7일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수.....	28
표 11. 14일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수.....	28
표 12. 7일째 Group 1,2의 MT 염색 후 fibrosis density.....	31
표 13. 14일째 Group 1,2의 MT 염색 후 fibrosis density.....	31
표 14. Group 1,2에서 공장 용모의 height 평가.....	34
표 15. 7일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 area density.....	37
표 16. 14일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 area density.....	37
표 17. 7일째 Group 1,2의 α -SMA 염색 발현 정도 density.....	40
표 18. 14일째 Group 1,2의 α -SMA 염색 발현 정도 density.....	40
표 19. 7일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수.....	43

표 20.	14일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수	43
표 21.	7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 fibrosis density	46
표 22.	14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 fibrosis density	46
표 23.	7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 fibrosis area density	49
표 24.	14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 fibrosis area density	49
표 25.	7일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 density	52
표 26.	14일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 density	52

그림 차례

그림 1. Group별 실험 과정	6
그림 2. 조직절편 채취 과정	9
그림 3. H&E 염색 후 장막 비교 (X40)	15
그림 4. 7일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰 (X100)	17
그림 5. 7일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프.....	17
그림 6. 14일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰 (X100)	18
그림 7. 14일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프.....	18
그림 8. 7일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100)	20
그림 9. 7일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis density 비교 그래프.....	20
그림 10. 14일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100)	21
그림 11. 14일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis density 비교 그래프	21
그림 12. 7일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density (X100)	23
그림 13. 7일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density 비교 그래프.....	23
그림 14. 14일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density (X100)	24
그림 15. 14일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density 비교 그래프.....	24
그림 16. 7일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density (X100)	26
그림 17. 7일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density 비교 그래프.....	26
그림 18. 14일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density (X100)	27
그림 19. 14일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density 비교 그래프.....	27

그림 20. 7일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰 (X100)	29
그림 21. 7일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프....	29
그림 22. 14일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰 (X100)	30
그림 23. 14일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프.	30
그림 24. 7일째 Group 1,2의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100)	32
그림 25. 7일째 Group 1,2의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프.....	32
그림 26. 14일째 Group 1,2의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100)	33
그림 27. 14일째 Group 1,2의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프....	33
그림 28. 7일째 Group 1,2의 PAS 염색을 통한 용모 크기 관찰 (X100) ..	35
그림 29. 7일째 Group 1,2의 PAS 염색 후 villous height score 비교 그래프.....	35
그림 30. 14일째 Group 1,2의 PAS 염색을 통한 용모 크기 관찰 (X100)	36
그림 31. 14일째 Group 1,2의 PAS 염색 후 villous height score 비교 그래프.....	36
그림 32. 7일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 관찰 (X100)	38
그림 33. 7일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프.....	38
그림 34. 14일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 관찰 (X100)	39
그림 35. 14일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프.....	39
그림 36. 7일째 Group 1,2의 α -SMA 발현 area density 관찰 (X100)	41
그림 37. 7일째 Group 1,2의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프.....	41
그림 38. 14일째 Group 1,2의 α -SMA 발현 area density 관찰 (X100) ..	42
그림 39. 14일째 Group 1,2의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프.....	42

그림 40. 7일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰 (X100) ……	44
그림 41. 7일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프…	44
그림 42. 14일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰 (X100) ……	45
그림 43. 14일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프…	45
그림 44. 7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100) ……	47
그림 45. 7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프…	47
그림 46. 14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100) ……	48
그림 47. 14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프…	48
그림 48. 7일째 Group 2,3의 VEGF 발현 area density(X100) ……	50
그림 49. 7일째 Group 2,3의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프…	50
그림 50. 14일째 Group 2,3의 VEGF 발현 area density (X100) ……	51
그림 51. 14일째 Group 2,3의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프…	51
그림 52. 7일째 Group 2,3의 α -SMA 발현 area density 관찰 (X100) ……	53
그림 53. 7일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프…	53
그림 54. 14일째 Group 2,3의 α -SMA 발현 area density 관찰 (X100) …	54
그림 55. 14일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프…	54

약어 정리

ROI - Region of interest

H&E - hematoXylin and eosin

D-PBS : dulbecco's phosphate-buffer saline

PBS : phosphate-buffer saline

PAS : Periodic-acid-Schiff stain

MT : Masson's trichrome stain

CD31 : cluster of differentiation 31

BSA : bovine serum albumin

VEGF : vascular endothelial growth factor

SDS : sodium dodecyl sulfate

α -SMA : α -smooth muscle actin

DAB: 3,3'-diamino-benzidine

서 론

공장 피관 이식술은 임상에서 하인두 및 식도 재건에 합리적인 성공률과 합병증 발생률 그리고 훌륭한 기능적인 역할을 하는 피관으로 많이 사용되어 왔다.^{1,2,3,4,5,6,7}

근육, 근막, 골피관 등 대부분의 유리 피관은 원래 혈액을 공급받던 주변 환경에서 떠나 혈관경을 통해 혈액을 공급받으며, 이에 더하여 이식된 조직으로부터 부수적인 혈관 재생을 일으킨다.⁸ 서로 다른 조직들은 주변 조직과 신생 혈관을 통한 연결을 형성하기 위해 각각 다른 시간이 필요하다.^{20,21}

그러나 공장 피관은 이와 달리 외경이 장막(serosa)으로 둘러싸여 있다. 이 장막은 편평상피세포층으로 본래 윤희성의 액체를 분비하여 장의 유착을 방지하고 마찰을 감소시키는 역할을 한다. 공장에서 이 장막이 피관으로의 혈관 신생을 저해하여 다른 피관과 달리 피관경에 의존하는 시기가 연장될 것이라는 가설이 있다.^{9,10}

실제 임상에서 하인두 종양을 광범위 절제술 후 공장 피관을 이용한 재건술을 시행하면 다시 이차적인 수술이 필요하거나 감염, 혈전으로 인해 지연 합병증이 생기는 경우가 있다.^{11,12,22} 또한 2차 수술 혹은 우발적인 외상으로 혈관경에 손상을 입혀, 결국 유리 피관이 지연 소실되는 경우가 나타난다고 보고되고 있다.^{13,14,15,16}

만약 이식한 공장 피관이 충분히 주변 조직과의 혈관 신생을 생성하지 못한 경우, 혈관경 손상으로 인해 피사가 일어나 조직 손상이 생길 가능성이 있다. 재수술의 이유가 아니더라도, 피관 이식술에 있어 빠르고 충분한 주변 조직과의 생착은 피관의 생존에 매우 중요한 요소이다.

실제로 다수 논문에서 유리 공장피판의 혈관경(pedicle)을 분할(division) 해도 생존할 수 있는 시기가 다른 근육 피판이나 근피판, 피부피판, 골피판에 비하여 늦다는 문헌 고찰을 통한 연구가 있다. 보통 피판이 생존하기 위한 임계 날짜는 그 범위가 8.5일에서 20.1일 정도이며, 그 중에 피부 피판, 골 피판, 근육 피판 순으로 빠르며, 유리 공장 피판 (jejunal free flap)이 20.1일로 가장 오래 걸리는 것으로 알려져 있다.⁷

한편 이식된 공장 피판의 serosa(장막)층이, 장의 신생 혈관 형성을 실제로 방해할 수 있음을 시사하는 일부 보고가 있다.¹⁷

이와 관련하여 진행된 선행 연구에서는 비글(Beagle)모델에서 공장 피판 이식(jejunal flap transfer) 후 신혈관 생성(neovascularization) 이 충분해지는 기간을 찾았다고 보고되었다. 그러나 이 연구에서는 장막에 조작을 가하지 않았고 serosa(장막)이 미치는 영향에 대한 임상적 혹은 그 기전에 대한 연구가 부족하다.²⁴

해부학적으로 공장은 전형적인 소장의 특징들을 갖추고 있는 부위로서 점막층(tunica mucosa), 점막하층(tunica submucosa), 근육층(tunica muscularis), 장막층(tunica serosa)을 뚜렷하게 구분할 수 있다. 공장의 내부 측면은 점막으로 이루어져 있고 점막층은 다음과 같은 층으로 나누어 진다. 장막은 장액을 분비하는 2 층의 중배엽으로 구성된다.

주된 혈류는 점막하층(submucosa)을 통해 공급되며, 장은 복강에서부터 단일 고유 동정맥 시스템에 의해 공급된다. 따라서 serosa층을 제거한다고 해도 혈관경으로 공급 되는 혈류에 영향을 미치지 않는다.

따라서, 이번 연구에서는 아래와 같은 가설을 설정하여 연구를 진행하였다.

가설1. 공장 피판과 근육 피판을 비교하였을 때, 이 두 그룹 간의 혈관 신생에 차이가 있다. 즉 공장 피판의 혈관 신생이 상대적으로 더 늦다.

가설2. 공장에서 장막을 부분적으로 제거하면 그렇지 않은 공장 피판에 비해 혈관 재생성이 빠르다.

가설 3. 공장 피판의 장막을 제거하면 혈관 신생은 근육 피판과 대등한 수준으로 증가한다.

연구재료 및 방법

연구재료

실험은 8주령 300g의 Sprague-Dawley종 랫드를 대상으로 실험을 시행 하였다. 총 18마리를 6마리씩 3개의 그룹으로 나누어서 실험하였다.

Group 1 (n=6) 에서는 공장 일부를 장간막 피판경에 기반하여 피판으로 분리하고, 분리된 공장 피판은 복부 피하(복직근막과 panniculus 층 사이의 공간)에 고정한다. 이때 Group 1은 공장을 그대로 매복하고 피부를 봉합한다.

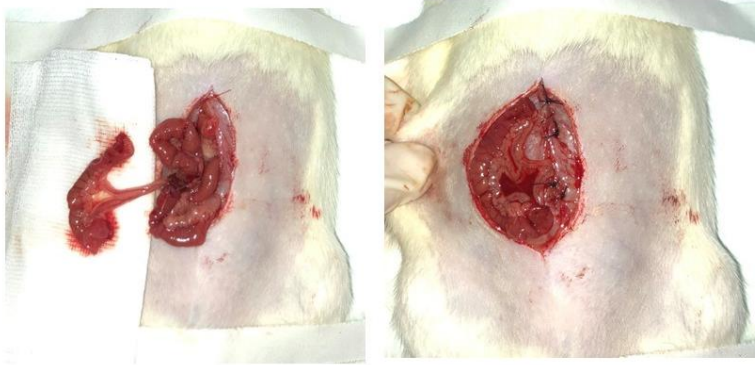
Group 2 (n=6) 에서는 공장 일부를 장간막 피판경에 기반하여 피판으로 분리하고, 분리된 공장 피판은 복부 피하(복직근막과 panniculus 층 사이의 공간)에 고정한다. 이때 Group 2는 장간막 피판경 반대 부분의 장막을 약 외경의 25% 정도 제거하고 매복한다. 피부를 봉합한다.

Group 3 (n=6) 에서는 한쪽 복직근의 전복직근막을 약 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 제거 한 후 panniculus를 다시 덮고 피부를 봉합한다.

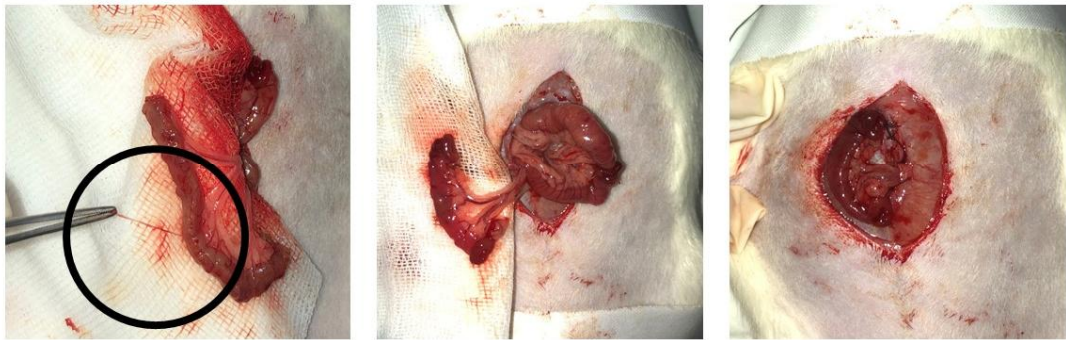
표 1. 실험군의 구성, 단위 : 마리

그룹			조직 절편 채취 시기		마리 수
	공장	장막	1주차	2주차	Total
1	+	+	3	3	6
2	+	-	3	3	6
3	-	-	3	3	6

G1



G2



G3



그림 1. Group 별 실험 과정

Group 1: 공장을 복직근과 피부 사이에 이식한다.

Group 2: 장막을 피관경 반대 부위에서 제거 후 공장을 복직근과 피부 사이에 이식한다.

Group 3: 복직근에 1x1cm²의 근막 제거만 한다.

수술 방법

랫드에 Zoletil 3ml(Tiletamine, Zolazepam, Virbac. France 40mg/Kg)과 Rompun 1ml (Xylazine HCL, Bayer. Korea 10mg/Kg)을 허벅지 근육주사로 마취한다. 랫드가 진정된 후, 배 부분을 제모한다.

수술 부위를 알콜 용액으로 소독하고 복부의 정중선을 따라 세로 선상으로 약 3cm정도 피부 절개를 한다. 피하 근막을 박리한 후, 정중부에서 수직으로 근육을 절개한다. 근육 절개 후 안에 랫드의 장기가 보이게 된다.

이때, 실험군 1에서는 랫드의 공장을 주변 조직과 박리한 후, 약 1.5-2cm의 길이로 피관 혈관경을 기반으로 분리하여 복강 안에서 꺼낸다. 자르고 남은 피관의 근위부 공장과 원위부 공장을 미세접합 수술 도구로 vicryl 5-0를 이용하여 문합하여 소화관이 다시 개통되도록 한다. 분리된 공장 피관은 복직근 위 (복직근만과 panniculus층 사이의 공간)에 1 stitch 로 봉합하여 고정한 후 매복을 한다.

실험군 2는 장간막 피관경 반대 부분에서 전체 둘레의 20~25%의 장막을 제거하고 매복한다. 이 상태에서 복근과 피부를 다시 봉합하되, 복근 봉합 시에는 장간막 피관경이 통과하는 부분을 남겨둔다.

실험군 3 (대조군)에서는 복부에 동일하게 세로 절개를 가하고, 한쪽 복직근의 전복직근막만을 제거하여 (약 1X1cm²) panniculus를 다시 덮고 피부를 봉합한다. 공장과 복직근 피관은 모두 좌측 배꼽 높이 부분에 오도록 하여 조직 채취 시에 불필요한 박리와 실험 범위 확대를 피한다.

수술 후 랫드는 6시간 금식을 유지한다. 실험 기간 동안 랫드는 세 마리씩 같은 군끼리 같은 케이지에서 생활하고, 물과 음식은 똑같이 자유롭게 섭취시킨다. 1주간 매일 동물의 상태와 상처를 관리한다. 수술 후 3일간 근주 내로 30mg/kg의 용량으로 amlicilin 항생제 주사한다. 수술 후 1회 Ketorolac 1mg/kg 근육주사로 투여한다.

또한 상온($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$)과 적당한 습도($60 \pm 5\%$) 그리고 12:12 시간의 비율로 낮, 밤의 주기를 유지한다. 모든 연구는 아산생명과학 연구소의 동물 실험 윤리 위원회의 승인 하에 시행하였고, 윤리 규정을 준수했다.

7일째 각군의 3마리를 CO_2 로 안락사를 시행 후 공장이나 복직근 피관이 매복된 부위 복부 위 우측, 배꼽 높이 $1 \times 2\text{cm}^2$ 을 전층으로 skin to muscle (피부 - 피관 - 아래의 복직근까지) 한 덩어리로 적출한다.

14일째 동일한 과정으로 남은 군의 3마리씩 진행한다.

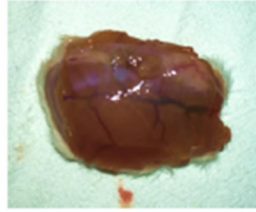
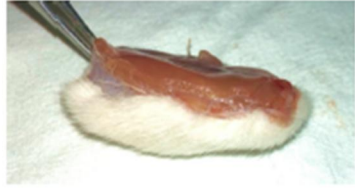


그림 2. 조직 절편 채취 과정

왼쪽: 조직의 단면, 가운데 : 조직의 뒷면

오른쪽: 조직 채취시 혈관경의 모습

결과 관찰 및 분석 방법

결과 관찰을 위하여 랫드를 1, 2 주차에 안락사하여 조직을 얻는다. 조직은 기존 봉합 부위를 포함하여, 약 2X2cm²의 정사각형 모양으로 채취한다. 이때 정사각형의 위아래로는 랫드의 피부 층, 공장 피관층, 복근 및 복벽층이 분리되지 않도록 조심스럽게 채취한 후, 한 덩어리로 획득한다. 이를 포르말린 용액에 담아 고정 후, 각 염색 수에 맞게 조직을 절편화하여 염색을 진행한다.

● CD31 염색을 조직학적 혈관 재생 비교

1주차 및 2주차 조직 절편의 CD31 염색을 통해 신생 혈관 생성이 잘 나타나는지를 확인 한다. 조직 표본을 실온에서 4% paraformaldehyde phosphate 용액에 30분간 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀 포매 하고 5 μ m 절편을 제작 하였다. 조직 슬라이드를 PBS 용액으로 5분간 3회 수세한 후, 비특이적 반응을 제거하고 세포막 항체가 통과하기 쉽게 하기 위하여 PBS에 2% BSA와 0.3%의 Triton X-100이 들어있는 블로킹 용액으로 실온에서 30분 처리하였다. 일차 항체 CD31(1:250, Merckmillipore, DE, MAB1393)은 블로킹 용액에 희석하여 배양접시에 넣고 4도씨에서 밤새 반응시켰다.

다음날 배양접시를 PBS로 5분간 3회 수세한 후 이차 항체 (biotinylated anti RAT IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA)를 블로킹 용액에 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS에서 5분간 3회 수세한 후 DAB(3,3'-diamino-benzidine) 용액을 세포에 처리하여 2분간 발색 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 광학 현미경 하에서 관찰하였다. 각 그룹의 혈관재생성이 일어나는 부분의 임의로 지정한 3곳에서 단위 길이 1000 μ m당 보이는 혈관의 숫자를 세어 혈관 생성 정도를 계산한다 (group 1,2의 경우 공장을 둘러싼 주변 조직 부분, group 3의 경우 복부 근육 층과 피부 층 사이 부분) 이를 통하여 신생혈관 생성이 주변으로 어느 정도 잘 되었는지 비교한다.

● Masson's trichrome stain 염색을 통한 조직학적 비교

1주차 및 2주차 조직 절편을 채취하여 4% paraformaldehyde phosphate 용액에 밤새 고정하였다. 고정된 파라핀을 포매하고 5 μ m 절편을 제작하였다. 조직 슬라이드를 Xylene 처리하여 파라핀을 제거하고 표준적인 방법으로 Masson's trichrome stain 염색을 진행한다. Collagen은 파란색으로 염색되며, 핵은 어두운 빨강 혹은 보라색으로, 세포질은 분홍색으로 염색 된다. 이로서 collagen을 잘 관찰할 수 있다. 이는 섬유화(fibrosis)가 되어지는 정도를 간접적으로 나타낸다.

각 그룹의 피관과 주변 조직 사이의 경계부(interphase)를 임의로 지정한 3곳을 100배로 촬영한다. Image J software를 사용하여 collagen으로 염색된 파란색 부분의 밀도(density)를 측정한다. (group 1,2의 경우 공장을 둘러싼 주변 조직부분, group 3의 경우 복부 근육 층과 피부 층 사이 부분).

● PAS 염색을 통한 비교

1주차 및 2주차 조직 절편의 PAS 염색을 통해 전형적인 공장의 특징들이 잘 나타나는지를 확인하여, 관류량(perfusion)이 잘 되었음을 확인한다. 다음과 같은 항목으로 평가 한다. 각각의 염색 절편에서, 융모높이(Villous height)가 500 μ m 이상으로 잘 자란(well growth) 경우 3점, 융모높이(Villous height)가 250 μ m 이상 500 μ m 이하로 적당히 자란 (moderate growth) 경우 2점, 융모높이(Villous height)가 250 μ m이하로 작게 자란(poor growth) 경우 1점으로 설정하고 점수를 부여하여 평균값을 계산한다.

● α -smooth muscle actin 면역 염색을 통한 조직학적 비교

1주차 및 2주차 조직 절편을 채취하여 4% paraformaldehyde phosphate 용액에 밤새 고정하였다. 조직 슬라이드를 PBS 용액으로 5분간 3회 수세한 후, 비특이적 반응을 제거하고 항체가 세포막을 통과하기 쉽게 하기 위하여 PBS에 2% BSA와 0.3%의 Triton X-100이 들어있는 블로킹 용액으로 실온에서 30분 처리하였다. 일차 항체 α -SMA(1:1000, Sigma-Aldrich, USA, A5228)는 블로킹 용액에 희석하여 배양접시에 넣고 4도씨에서 밤새 반응시켰다. 다음날 배양접시를 PBS로 5분간 3회 수세한 후 이차항체(biotinylated anti RAT igG, santa, USA)를 블로킹 용액에 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS에서 5분간 3회 수세한 후 DAB 용액을 세포에 처리하여 2분간 발색 반응시켰다.

반응이 끝난 세포는 광학 현미경 하에서 관찰하였다. α -SMA는 미오세포(myofibroblast)와 북형간충질세포(spindle shaped mesenchymal cell)에서 발견되는 것으로, 이는 상처치유(wound healing) 과정에서 필요한 세포 외 기질의 구축에 있어서 핵심적인 역할을 한다. 따라서, 이는 상처치유(wound healing) 되는 정도를 간접적으로 나타낸다. 각 그룹의 피관과 주변 조직 사이의 경계부를 임의로 지정한 3곳에서 100배로 촬영한다. Image J software를 사용하여 collagen으로 염색된 파란색 부분의 밀도(density)를 측정한다. (group 1,2의 경우 공장을 둘러싼 주변 조직부분, group 3의 경우 복부 근육 층과 피부 층 사이 부분).

● VEGF 면역 염색을 통한 조직학적 비교

1주차 및 2주차 조직 절편을 채취하여 4% paraformaldehyde phosphate 용액에 밤새 고정하였다. 조직 슬라이드를 PBS 용액으로 5분간 3회 수세한 후, 비특이적 반응을 제거하고 항체가 세포막을 통과하기 쉽게 하기 위하여 PBS에 2% BSA와 0.3%의 Triton X-100이 들어있는 블로킹 용액으로 실온에서 30분 처리하였다. 일차 항체 VEGF(1:100, Abcam, UK, ab1316)는 블로킹 용액에 희석하여 배양접시에 넣고 4도씨에서 밤새 반응 시켰다. 다음날 배양접시를 PBS로 5분간 3회 수세한 후 이차항체(biotinylated anti RAT IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 블로킹 용액에 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS에서 5분간 3회 수세한 후 3,3'-diamino-benzidine (DAB) 용액을 세포에 처리하여 2분간 발색 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 광학 현미경 하에서 관찰하였다.

● 염색 조직 정량화 방법

MT stain 조직 절편에서 섬유화(fibrosis) 정도를 측정할 때 다음과 같은 순서를 따랐다. 1. 이미지를 그레이 스케일로 변환, 2. 임계 값을 사용하여 푸른 색의 콜라겐을 분절, 3. 임계 면적 측정 (ROI- range of interest). Image J 프로그램을 사용하여, Image>Type>RGB Stack 명령을 사용하여 이미지를 빨강, 녹색 및 파랑 채널로 분할하고 여기서 우리는 파랑 채널을 사용한다. 왜냐하면 image J의 임계 값 도구는 회색조 이미지에서만 작동하기 때문이다. RGB Stack (파랑 채널이 선택된 상태)을 선택하고 Image>Adjust>Threshold를 누른다. 임계 값 도구가 열리고 파랑 채널이 자동으로 임계 값이 된다. "set"을 클릭하고 상위 레벨을 175/2 또는 87로 설정한다. 자동 결정 임계 값의 일부인 임계 값을 설정하면 나중에 수동 임계 값을 요구하지 않는 매크로를 작성할 수 있다. 그런 다음 화면에서 원하는 면적을 ROI로 임의 다각형 선택하여 결정한다. 이 논문에서는 공장 바깥 부분 panniculus을 선택한다. 근육 피판의 경우 근육 바깥쪽 panniculus을 선택한다. 그런 다음 "m"(Analyse>Measure)을 누르면 영역 및 백분율 영역이 "결과"창에 표시된다.

VEGF stain에서 염색 정도를 측정할 때 갈색의 염색 면적을 분절후 위와 동일한 방법으로 시행한다. 1. 이미지를 그레이 스케일로 변환, 2. 임계 값을 사용하여 갈색의 염색 면적을 분절, 3. 임계 면적 측정 (ROI- range of interest) 후 동일한 과정을 반복한다.

α -SMA stain에서 염색 정도를 측정할 때 갈색의 염색 면적을 분절 후 같은 방법으로 시행한다. 1. 이미지를 그레이 스케일로 변환, 2. 임계 값을 사용하여 갈색의 염색 면적을 분절, 3. 임계 면적 측정 (ROI- range of interest), "set"을 클릭하고 상위 레벨을 150으로 설정한다. 이후 동일한 과정을 반복한다.

통계적 분석

정량화한 다음의 수치들은 평균 \pm 표준편차 (mean \pm standard deviation)으로 나타내었다. 세 그룹간 비교는 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal wallis test)를 시행하였고 두 그룹간 비교는 만-휘트니 검정(mann-whitney test)를 시행하였다. P값이 0.05보다 작을 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다. 모든 자료는 Graph pad prism software 8 version을 사용하여 분석하였다.

결과

모든 실험 동물은 실험 기간 중 특별한 문제가 없이 생존하여 도중에 제외된 동물은 없었다.

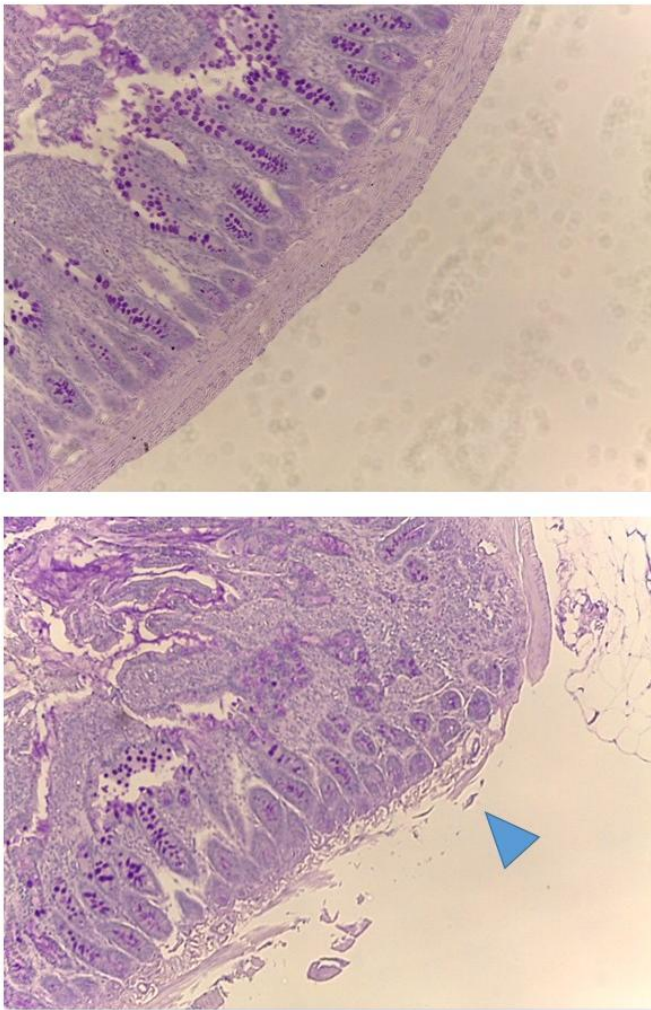


그림 3. H & E 염색 후 장막 비교 (X40)

위쪽 현미경 사진: 정상 장막을 가진 공장,

아래쪽 현미경 사진: 장막을 제거한 공장,

파란 화살표: 제거된 장막 부분

1-1. 공장 피관과 근육 피관 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피관에서 주변 조직으로의 신생 혈관 개수가 유의하게 적었다.

공장 피관과 근육 피관에서 CD31 염색을 통해 Panniculus와 피관 사이 경계에서 신생 혈관 개수를 비교하였을 때, 공장 피관에서 그 숫자가 유의하게 적었다.

표 2. 7일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수(P <0.0001)

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	2	3	3	2.44
	1-2	4	1	2	
	1-3	3	2	2	
3	3-1	6	3	5	5.11
	3-2	7	5	5	
	3-3	7	3	5	

표 3. 14일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수(P <0.0001)

14days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	4	3	3	2.8
	1-2	3	2	3	
	1-3	2	4	2	
3	3-1	7	10	5	7
	3-2	10	4	4	
	3-3	8	6	9	

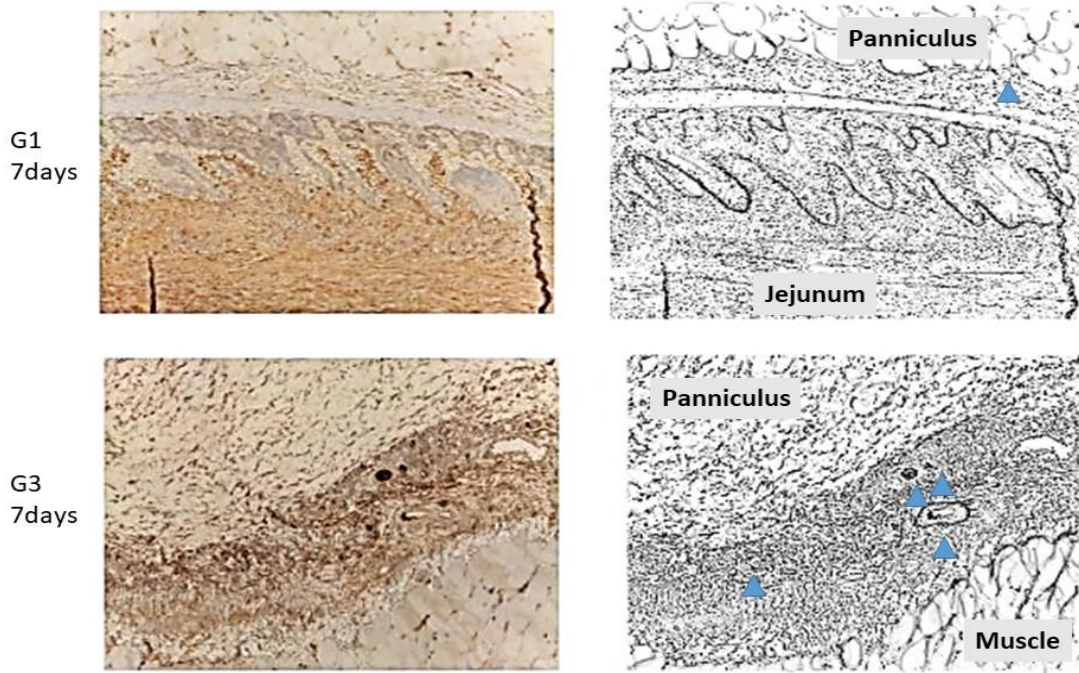


그림 4. 7일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰

좌: CD31 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판과 근육 피판의 Panniculus와 피판 사이 경계에서 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 신생 혈관 개수가 유의하게 적음을 관찰할 수 있다. (화살표: 혈관)

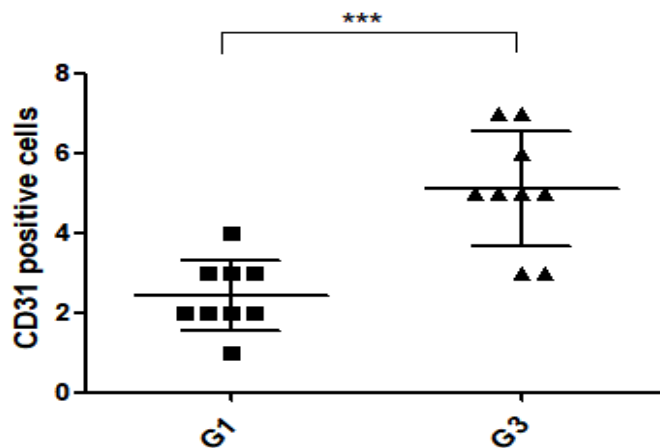


그림 5. 7일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프

CD31 염색을 통해 신생혈관 개수를 분석한 결과 G1(평균치 2.44)은 G3(평균치 5.11)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.0001$)

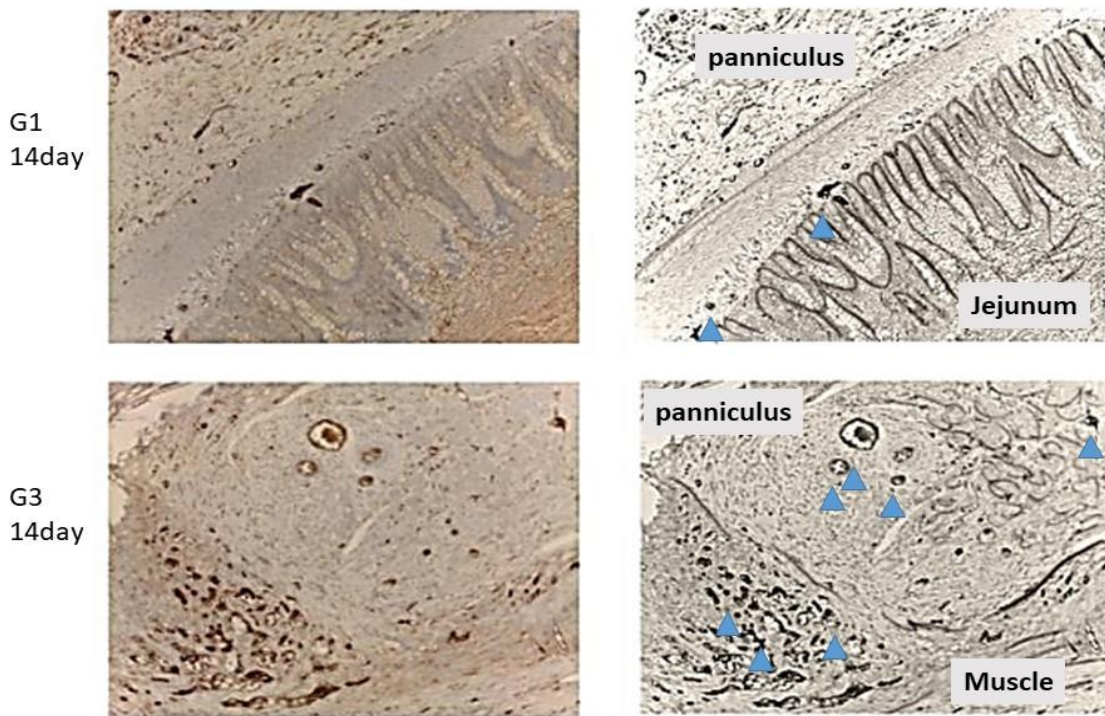


그림 6. 14일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰
 좌: CD31 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도
 공장 피판과 근육 피판의 Panniculus와 피판 사이 경계에서 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피판에서 주변 조직으로의 신생 혈관 개수가 유의하게 적음을 관찰할 수 있다. (화살표: 혈관)

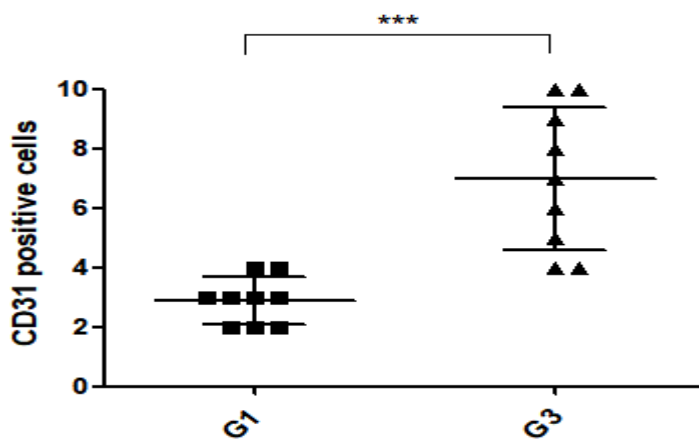


그림 7. 14일째 Group 1,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프
 CD31염색을 통해 신생혈관 개수를 분석한 결과 G1(평균치 2.8)은 G3(평균치 7)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.0001)

1-2. 공장 피관과 근육 피관 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피관이 주변 조직과 섬유화가 상대적으로 덜 일어났다.

공장 피관군에서 주변 조직과의 섬유화 정도가 근육 피관에 비해 유의하게 적었다. 1주차 및 2주차 조직 절편의 MT 염색을 통해 주변 조직 사이의 경계를 임의로 지정한 3곳에서 collagen으로 염색된 파란색 부분의 밀도로 확인하였다.

표 4. 7일째 Group 1,3의 MT 염색 후 fibrosis density (P <0.001)

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	2-1	15	24.1	38.2	26.7
	2-2	30.1	33.2	21.1	
	2-3	24.1	25.1	30.1	
3	3-1	25.3	48.5	43.7	37.6
	3-2	34	26.8	41.3	
	3-3	43.7	41.3	34	

표 5. 14일째 Group 1,3의 MT 염색 후 fibrosis density (P <0.0001)

14days		zone1	zone2	zone3	
1	2-1	45.1	22.4	22.3	27.8
	2-2	30.9	27.5	23.8	
	2-3	25.5	23.6	29.3	
3	3-1	42.6	40.9	51.2	47
	3-2	47.2	61.2	43.3	
	3-3	49.5	42.1	45.1	

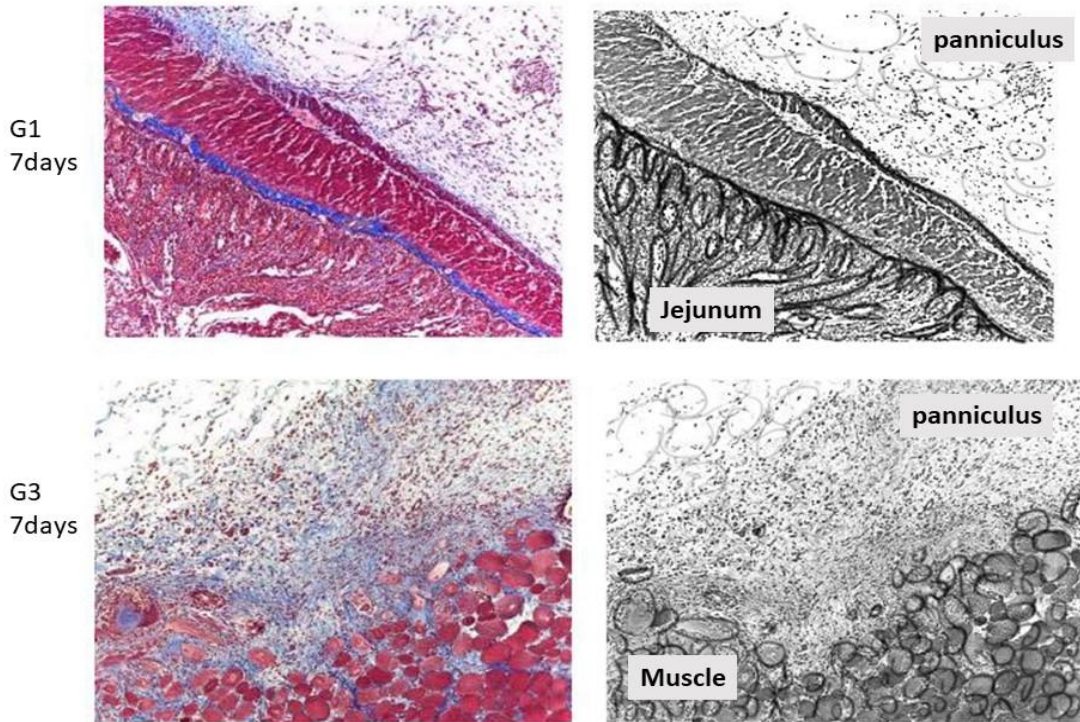


그림 8. 7일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰

좌: MT 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판과 근육 피판 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피판의 Panniculus에서 주변 조직과 섬유화(파란부분)가 상대적으로 덜 일어났음을 관찰할 수 있다.

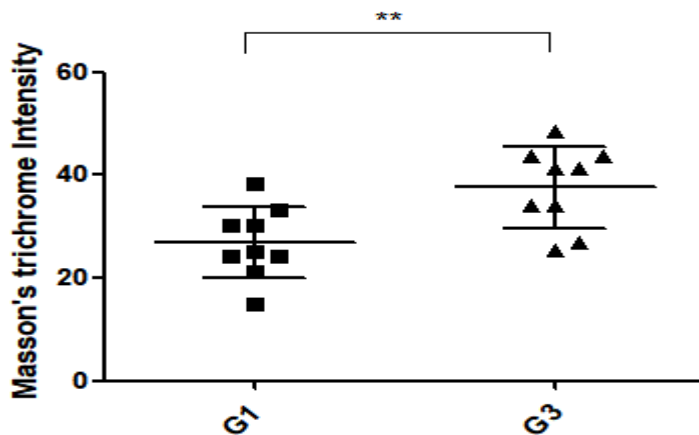


그림 9. 7일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 Collagen 밀도를 분석한 결과 G1(밀도 평균치 26.7)은 G3(밀도 평균치 37.6)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.001$)

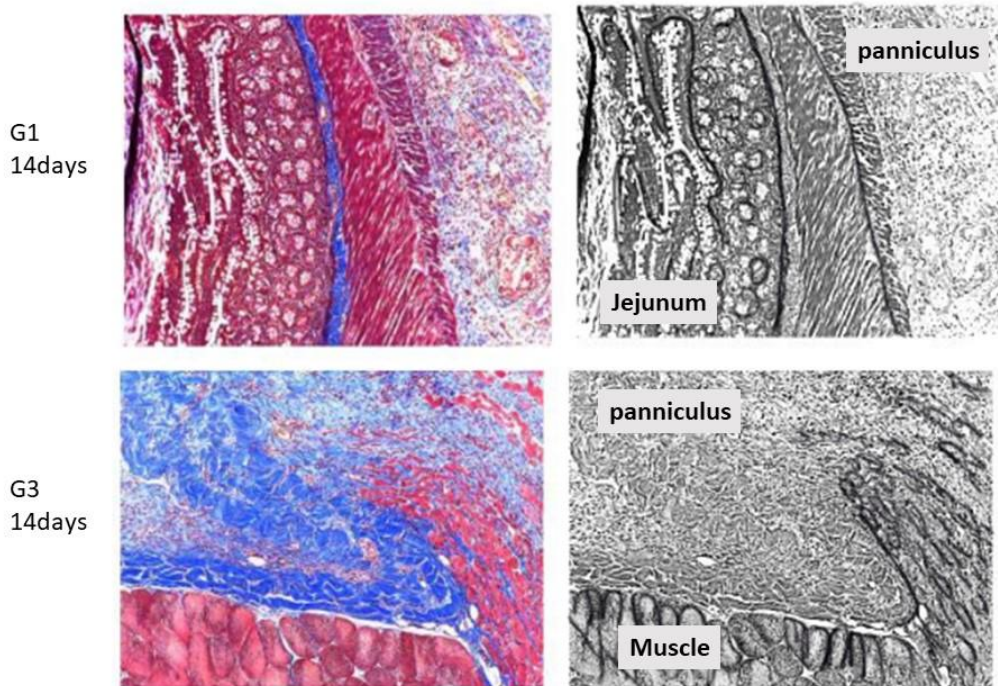


그림 10. 14일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰 (X100)

좌: MT 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피관과 근육 피관 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피관의 Panniculus에서 주변 조직과 섬유화(파란부분)가 상대적으로 덜 일어났음을 관찰할 수 있다. 진한 파란색 줄 부분은 공장의 구조이고 섬유화가 아니다.

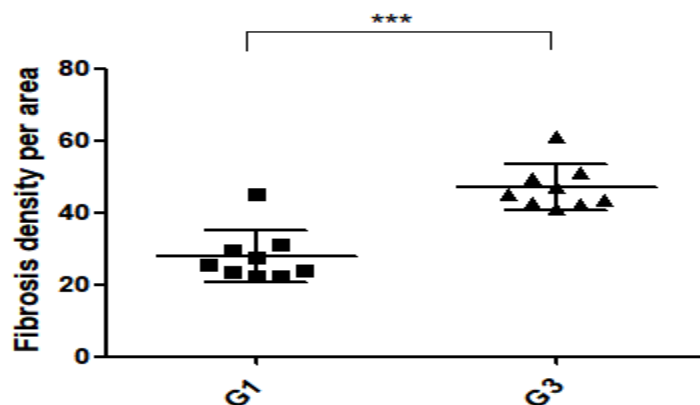


그림 11. 14일째 Group 1,3의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 Collagen 밀도를 분석한 결과 G1(밀도 평균치 27.8)은 G3(밀도 평균치 47)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.0001$)

1-3. 공장 피관과 근육 피관 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피관의 주변 조직에서 VEGF 발현의 차이는 유의하지 않았다.

공장 피관군에서 주변조직과의 VEGF 발현은 1주차에서 공장 피관군이 근육 피관군에 비해 큰 차이가 없었다. 2주차에 모두 공장 피관군에서 주변조직과의 VEGF 발현이 근육 피관보다 유의하게 적게 나타났다.

표 6. 7일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density (P<0.01)

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	7.1	10.6	10.5	8.6
	1-2	11.2	8.9	7.1	
	1-3	8.1	8.5	5.4	
3	3-1	13.4	14.3	7.2	10.6
	3-2	8.3	10.2	13.3	
	3-3	11.4	9.3	8.2	

표 7. 14일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density (P<0.001)

14days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	11.4	5.9	7.5	6.6
	1-2	9.3	3.6	7.8	
	1-3	5.9	2.6	6.1	
3	3-1	12.2	14.8	12.9	10.2
	3-2	14.5	9	8.5	
	3-3	10.2	5.6	4.6	

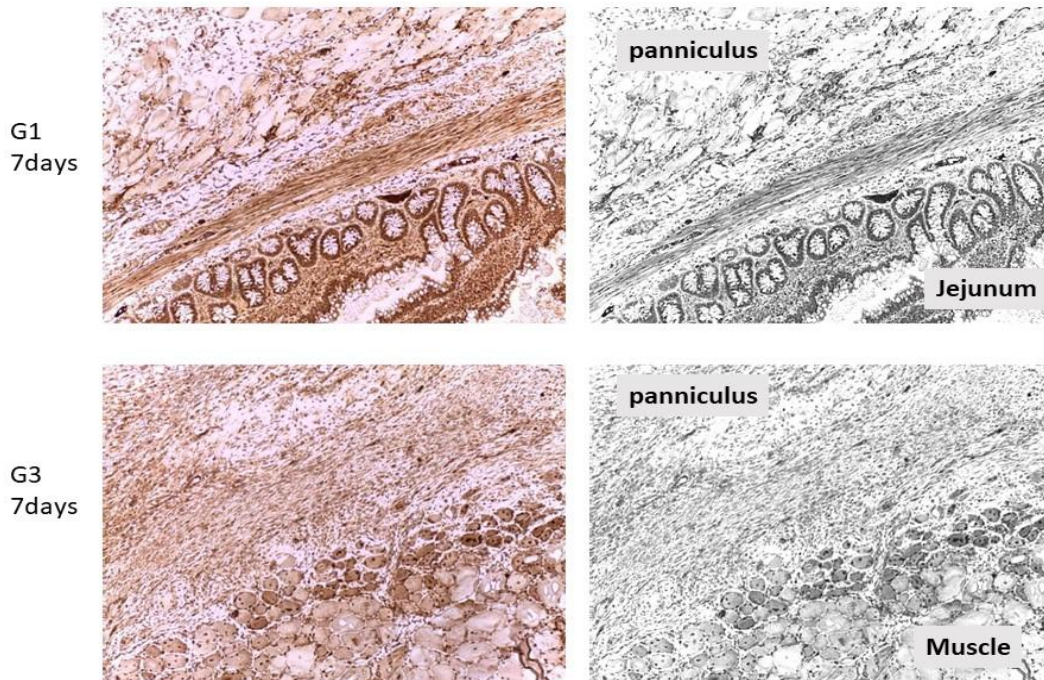


그림 12. 7일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density

좌: VEGF 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판의 Panniculus에서 VEGF 발현이 1주차에 근육 피판보다 발현이 큰 차이를 보이지 않았다.

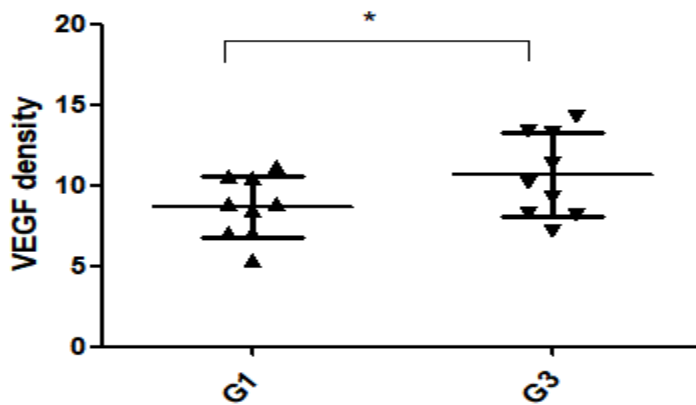


그림 13. 7일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 VEGF 발현을 분석한 결과 G1(밀도 평균치 8.6)은 G3(밀도 평균치 10.6)과 유의하게 발현되었으나 큰 차이가 없었다. (P < 0.01)

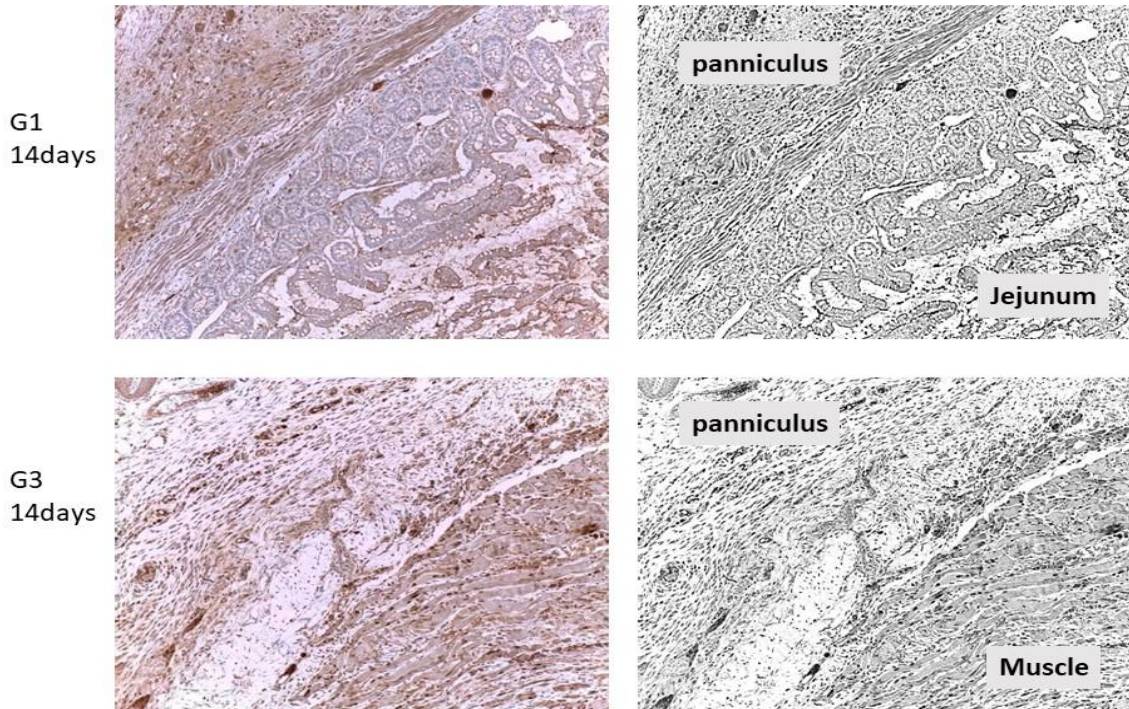


그림 14. 14일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density

좌: VEGF 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

2주차 공장 피판의 Panniculus에서 VEGF 발현이 근육 피판보다 유의하게 적게 나타났다.

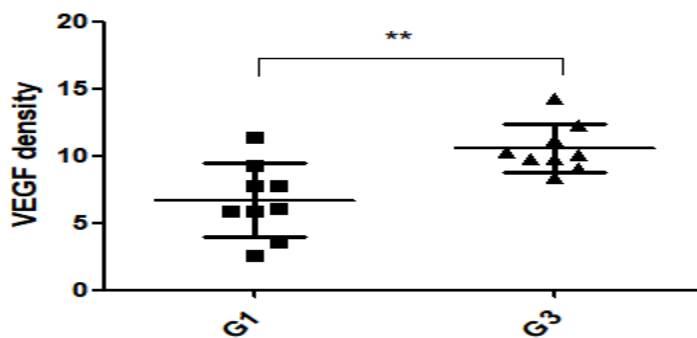


그림 15. 14일째 Group 1,3의 VEGF 발현 area density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개구역을 지정하여 VEGF 발현을 분석한 결과 G1(밀도 평균치 6.6)은 G3(밀도 평균치 10.2)과 유의하게 적게 발현되었다. ($P < 0.001$)

1-4. 공장 피판과 근육 피판 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피판의 주변 조직에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

공장 피판군에서 주변조직과의 α -SMA 발현이 근육 피판에 비해 발현이 적게 나타났다. 1주차 및 2주차 조직 절편의 α -SMA 염색을 통해 주변 조직 사이의 경계를 임의로 지정한 3곳에서 α -SMA 염색된 부분의 밀도로 확인하였다.

표 8. 7일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density (P < 0.0001)

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	25.6	12.9	16.3	15.4
	1-2	11.6	16.3	16	
	1-3	15.3	12.2	12.9	
3	3-1	23.3	34.8	33.8	33.2
	3-2	32.8	30.9	42.16	
	3-3	33.9	35.1	32.8	

표 9. 14일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density (P < 0.01)

14days		zone1	zone2	zone3	
1	1-1	36.8	11.6	28.1	17.2
	1-2	13.1	14.5	11.1	
	1-3	11.2	13.1	15.5	
3	3-1	25.4	23.9	23.3	25.7
	3-2	24.5	21	24.6	
	3-3	37.3	23.6	27.7	

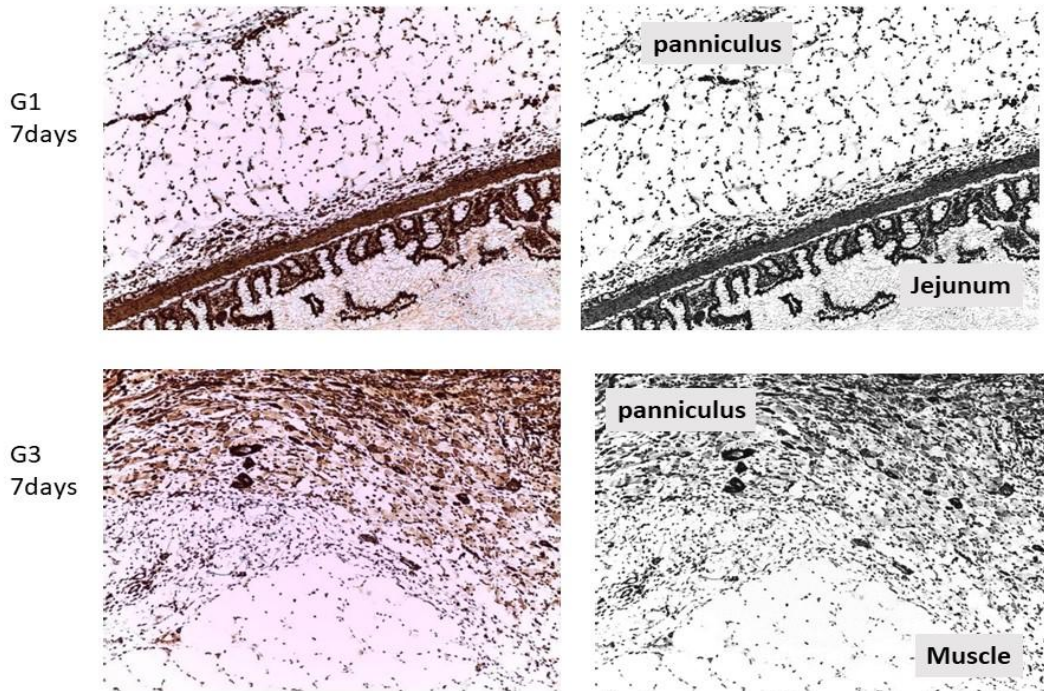


그림 16. 7일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density 관찰

좌: α -SMA 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

두 그룹의 Panniculus와 피판 사이 경계에서 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피판의 주변 조직에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

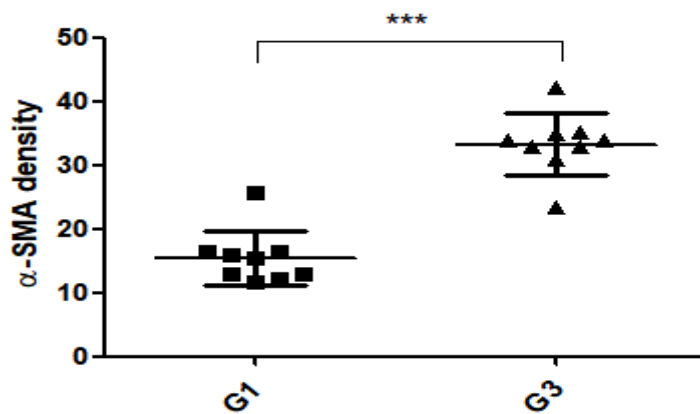


그림 17. 7일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개구역을 지정하여 α -SMA 분석한 결과 G1(밀도 평균치 15.4)은 G3(밀도 평균치 33.2)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.0001)

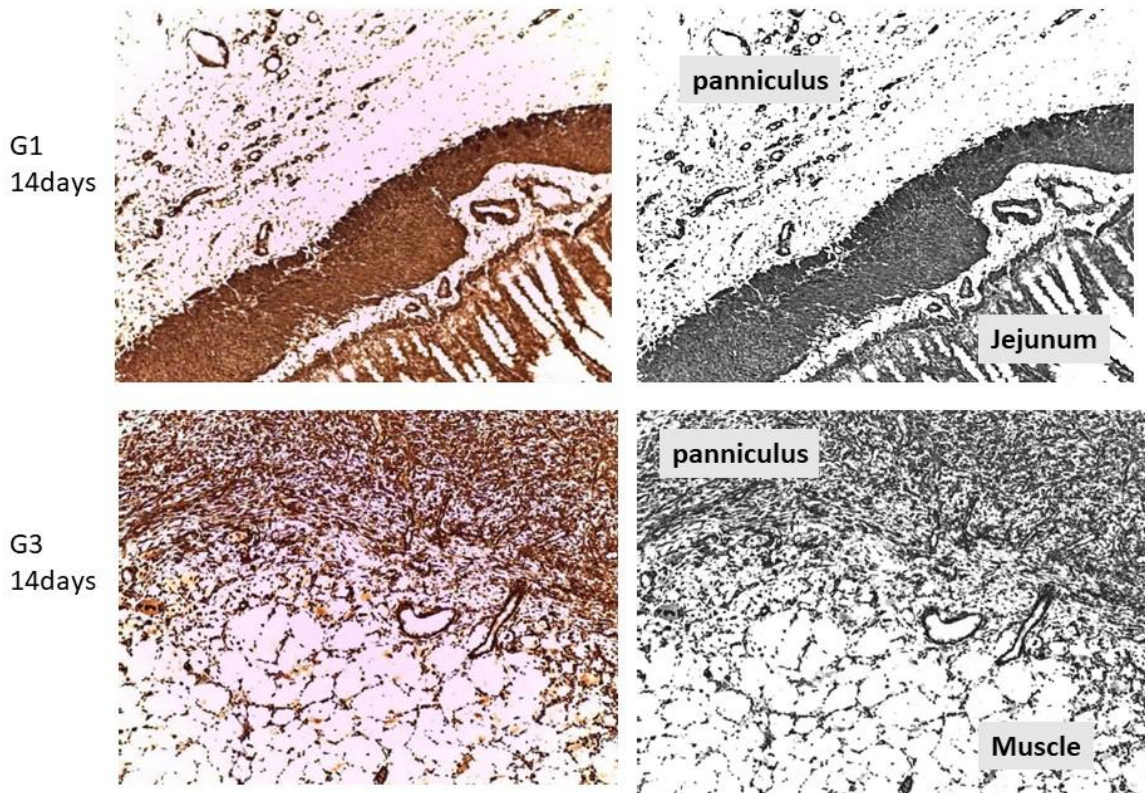


그림 18. 14일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density 관찰

좌: α -SMA 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

두 그룹의 Panniculus와 피관 사이 경계에서 (Group 1, 3)을 비교하였을 때 공장 피관의 주변 조직에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

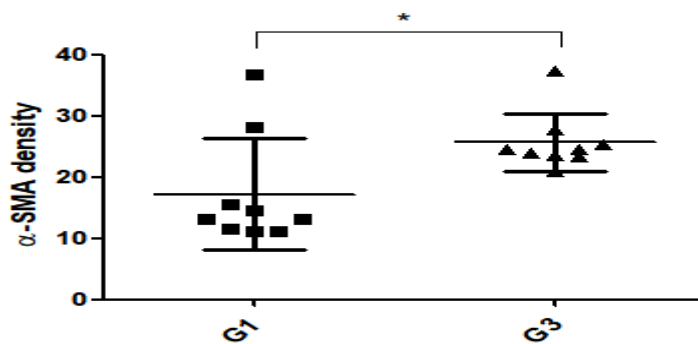


그림 19. 14일째 Group 1,3의 α -SMA 발현 area density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 α -SMA 분석한 결과 G1(밀도 평균치 17.2)은 G3(밀도 평균치 25.7)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.01$)

2-1. 공장 피관과 장막 제거 공장 피관(Group 1, 2)을 비교하였을 때 장막을 제거한 군에서 혈관 생성이 상대적으로 더 많이 일어났다.

공장 피관과 장막 제거 공장 피관을 CD31 염색을 통해 Panniculus와 피관 사이 경계에서 신생 혈관 개수를 비교하였을 때, 공장 피관에서 그 숫자가 유의하게 적었다.

표 10. 7일째 Group 1,2 의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수 (P < 0.001)

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	2	3	3	2.44
	1-2	4	1	2	
	1-3	3	2	2	
2	2-1	4	5	4	3.88
	2-2	4	3	4	
	2-3	3	3	5	

표 11. 14일째 Group 1,2 의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수 (P < 0.0001)

14days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	4	3	3	2.8
	1-2	3	2	3	
	1-3	2	4	2	
2	2-1	6	2	7	4.8
	2-2	5	5	4	
	2-3	5	4	6	

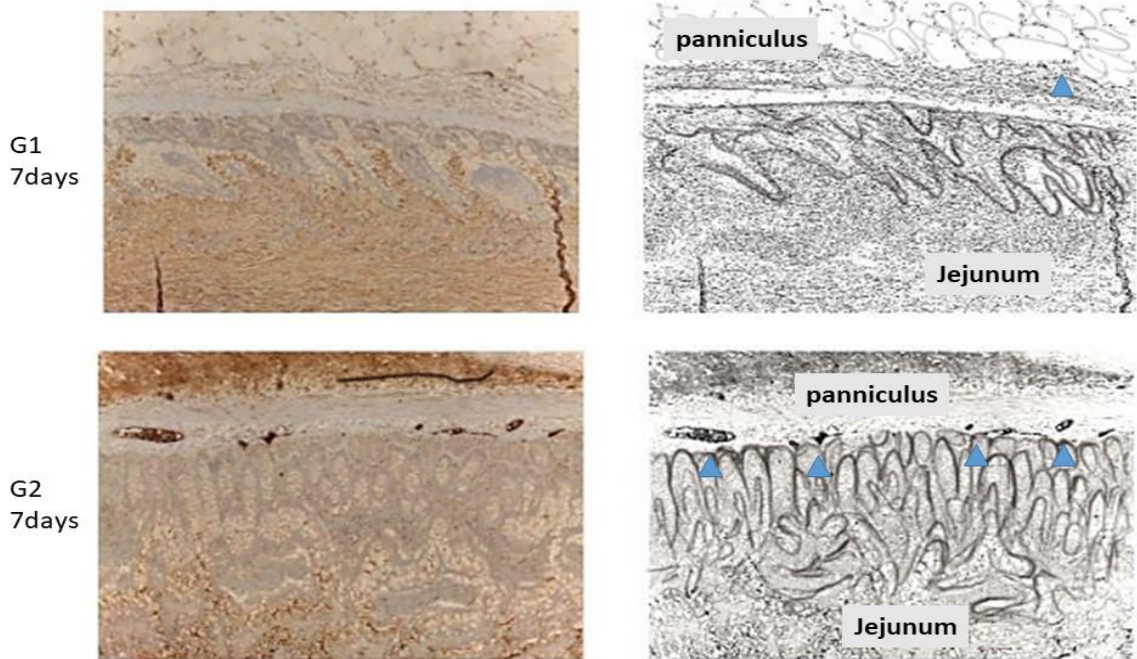


그림 20. 7일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰
 좌: CD31 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도
 공장 피관과 장막제거 공장 피관(Group 1, 2)을 비교하였을 때 장막을 제거한 군에서
 혈관 생성이 상대적으로 많이 일어났다. (화살표: 혈관)

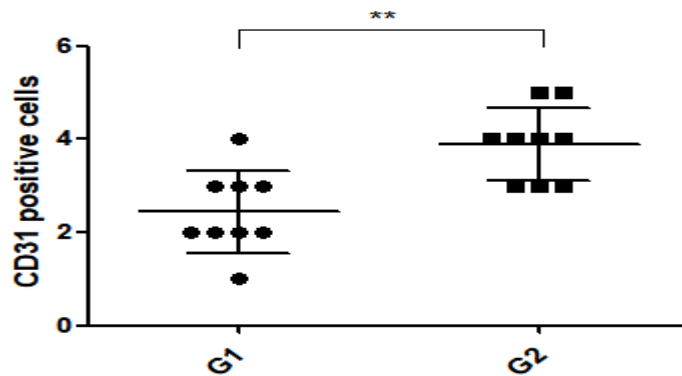


그림 21. 7일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프
 CD31 염색을 통해 신생 혈관 개수를 분석한 결과 G1은(평균치 2.44), G2(평균치
 3.88)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.001)

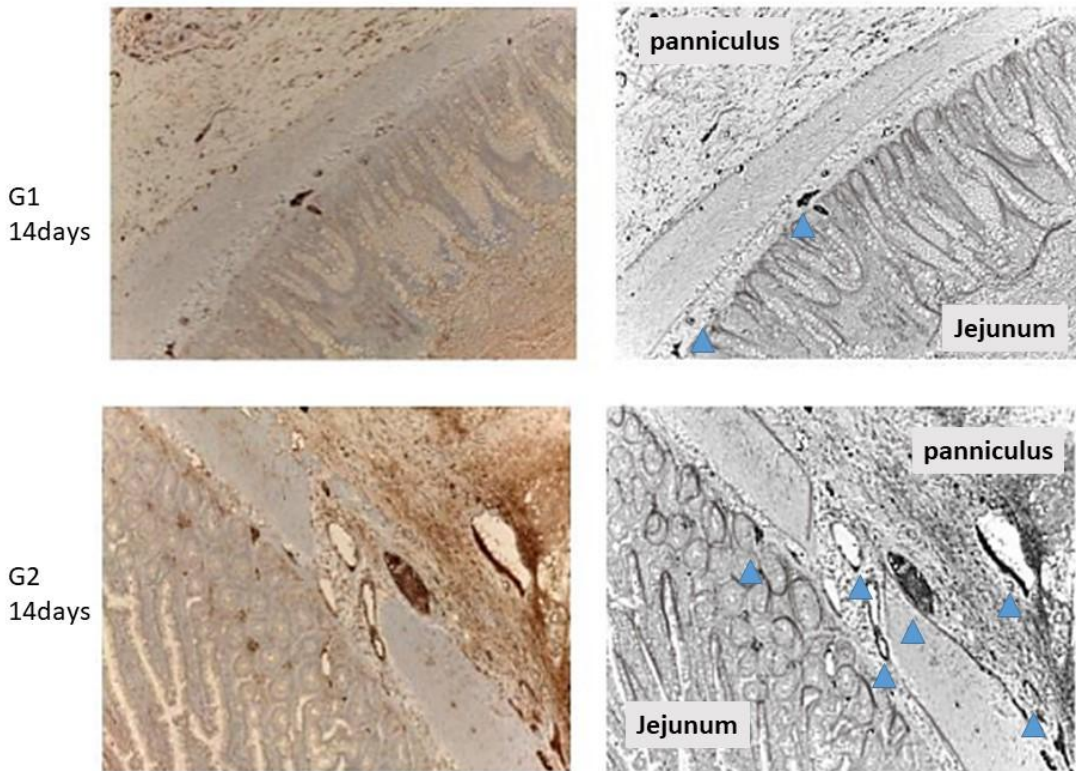


그림 22. 14일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰

좌: CD31 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 장막을 제거한 군에서 혈관 생성이 상대적으로 더 많이 일어났다. (화살표: 혈관)

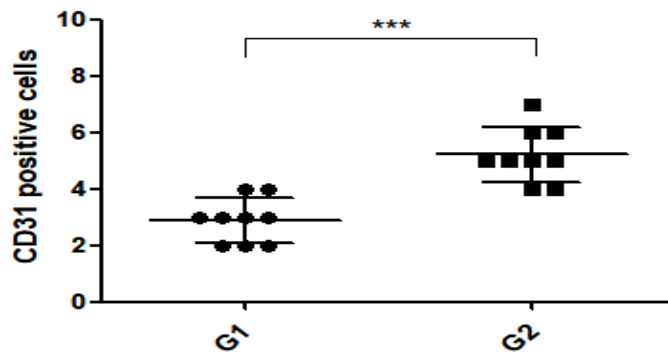


그림 23. 14일째 Group 1,2의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프

CD31염색을 통해 신생혈관 개수를 분석한 결과 G1(평균치, 2.8)은 G2(평균치 4.8)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.001)

2-2. 공장 피관과 장막 제거 공장 피관(Group 1, 2)을 비교하였을 때 장막을 제거한 군에서 주변 조직과 섬유화가 상대적으로 더 많이 일어났다.

공장 피관과 장막 제거 공장 피관을 MT 염색을 통해 Panniculus와 피관 사이 경계에서 collagen으로 염색된 파란색 부분의 density를 비교하였을 때, 1주차와 2주차에 모두 장막 제거 공장 피관에서 그 섬유화 정도가 유의하게 많았다.

표 12. 7일째 Group 1,2의 MT 염색 후 fibrosis density (P < 0.001)

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	15	24.1	25.6	25
	1-2	30.1	30.2	21.1	
	1-3	24.1	25.1	30.1	
2	2-1	24.2	33	40	31.1
	2-2	33	30.9	32.3	
	2-3	32.8	26	28.1	

표 13. 14일째 Group 1,2의 MT 염색 후 fibrosis density (P < 0.01)

14days		zone1	zone2	zone3	
1	2-1	45.1	22.4	22.3	27.8
	2-2	30.9	27.5	23.8	
	2-3	25.5	23.6	29.3	
2	1-1	29.2	24.2	35.2	35.7
	1-2	31.1	29.2	48.1	
	1-3	48.1	27.9	49	

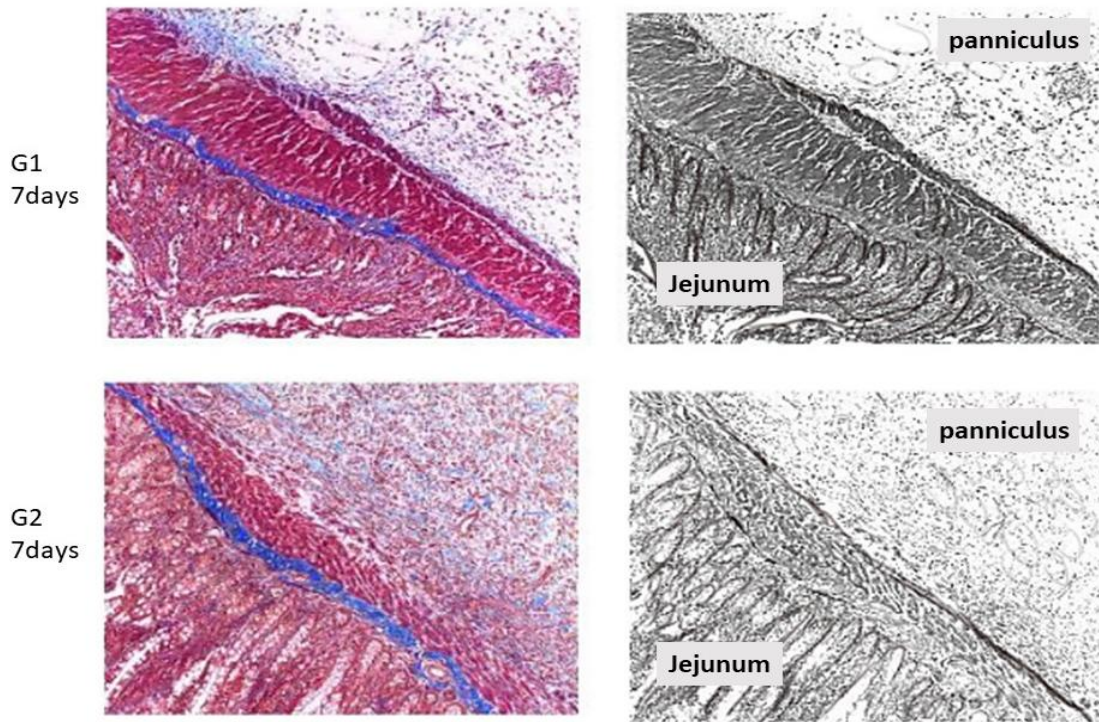


그림 24. 7일째 Group 1,2,의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰

좌: MT 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 장막을 제거한 군의 Panniculus에서 주변 조직과 섬유화(파란부분)가 상대적으로 더 많이 일어났다. 진한 파랑 부분은 공장의 구조이고 섬유화가 아니다.

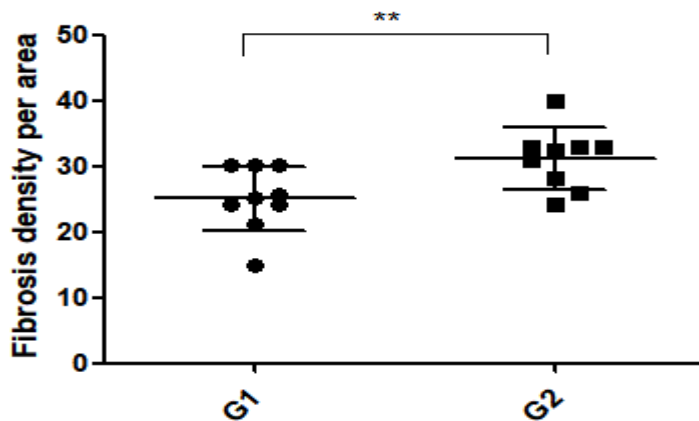


그림 25. 7일째 Group 1,2,의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개구역을 지정하여 Collagen 밀도를 분석한 결과 G1(밀도 평균치 25)은 G2(밀도 평균치 31.1)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.001$)

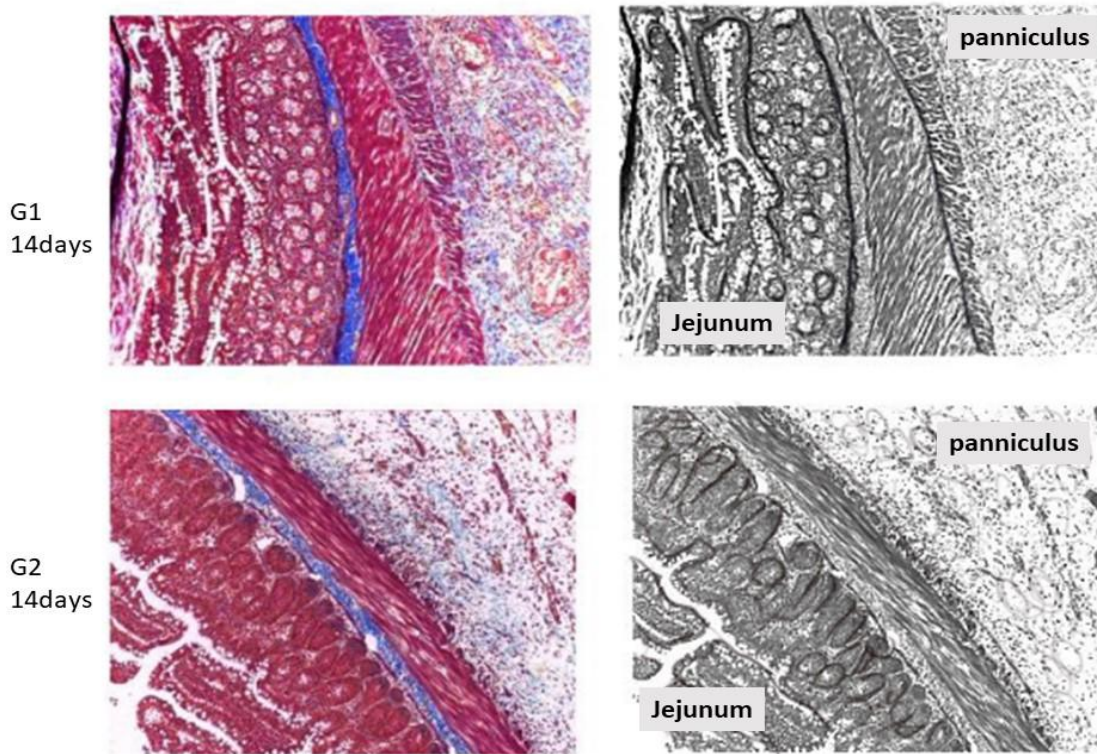


그림 26. 14일째 Group 1,2의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰

좌: MT 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 장막을 제거한 군의 Panniculus에서 주변 조직과 섬유화(파란부분)가 상대적으로 더 많이 일어났다. 진한 한줄 파랑 부분은 공장의 구조이고 섬유화가 아니다.

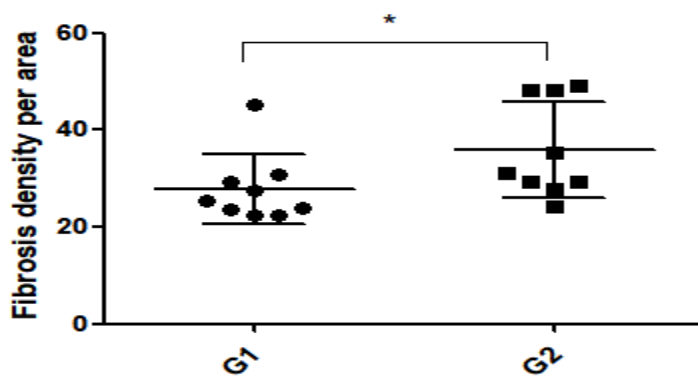


그림 27. 14일째 Group 1,2의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 Collagen 밀도를 분석한 결과 G1(밀도 평균치 27.8)은 G2(밀도 평균치 35.7)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.01$)

2-3. 공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 공장 피판의 용모 크기가 장막 제거 공장 피판에 비해 유의하게 작았다.

PAS 염색을 통해 용모를 관찰하여, 그 height를 측정하였다. 공장 피판에서 height의 정도가 장막 제거한 공장 피판에 비해 유의하게 작았다. 1주차 및 2주차 조직 절편의 PAS 염색을 주변 조직 사이의 경계를 임의로 지정한 3곳에서 확인하였다.

표 14. Group 1,2에서 공장 용모의 height 평가

7day		Zone1	Zone2	Zone3	Mean
G1	1-1	2	1	2	1.5
	1-2	2	1	1	
	1-3	1	2	2	
G2	1-1	3	3	3	2.7
	1-2	3	2	3	
	1-3	3	3	2	
14day		Zone1	Zone2	Zone3	Mean
G1	1-1	2	1	3	1.8
	1-2	2	2	1	
	1-3	3	1	2	
G2	1-1	3	3	3	2.77
	1-2	3	2	3	
	1-3	2	3	3	

Well growth = SCORE 3 (>500 μ m)
 Moderate growth = SCORE 2 (250 μ m-500 μ m)
 Poor growth = SCORE 1 (<500 μ m)

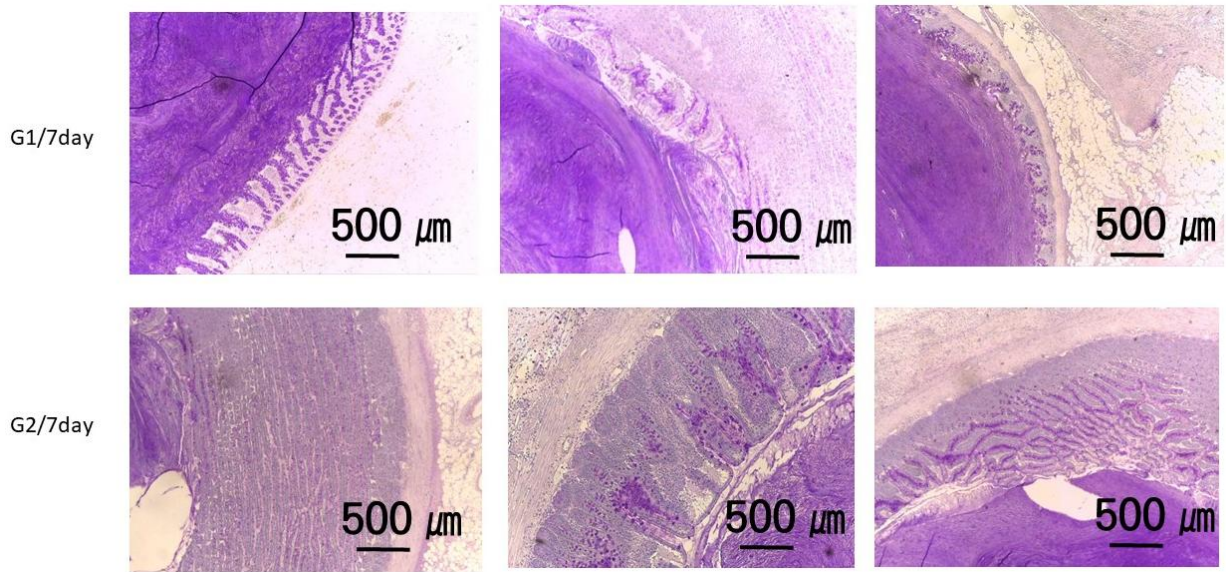


그림 28. 7일째 Group 1, 2의 PAS 염색을 통한 용모 크기 관찰

공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 공장 피판의 용모 크기가 장막 제거 공장 피판에 비해 유의하게 작았다.

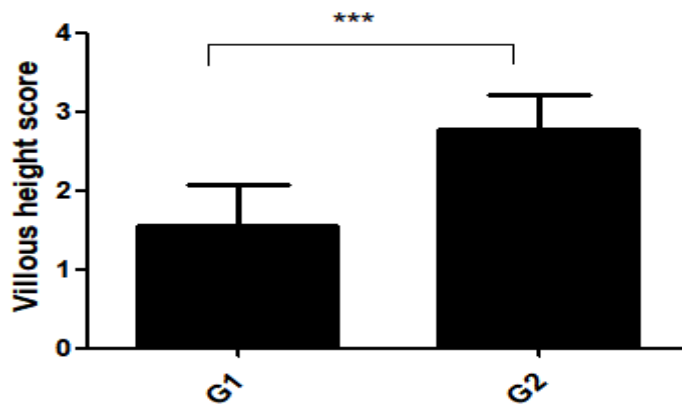


그림 29. 7일째 Group 1, 2의 PAS 염색 후 villous height score 비교

관류량을 보여주는 용모크기를 점수화하여 분석한 결과 G1(점수화 평균치 1.5)은 G2(점수화 평균치 2.7)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.0001)

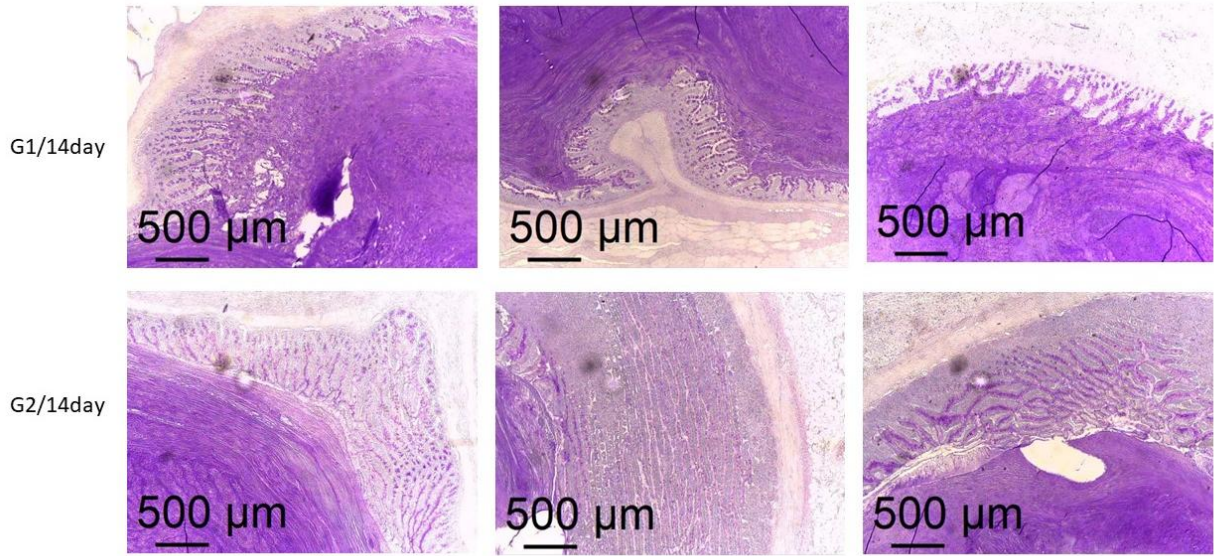


그림 30. 14일째 Group 1,2의 PAS 염색을 통한 용모 크기 관찰 (X100)

공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 공장 피판의 용모 크기가 장막 제거 공장 피판에 비해 유의하게 작았다.

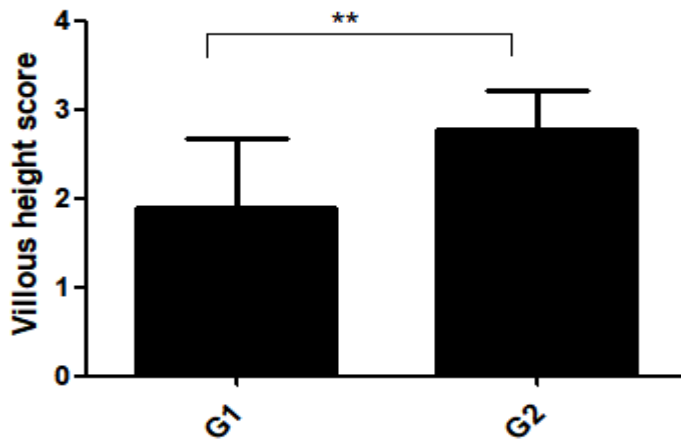


그림 31. 14일째 Group 1,2의 PAS 염색 후 villous height score 비교 그래프

관류량을 보여주는 용모크기를 점수화하여 분석한 결과 G1(점수화 평균치 1.8)은 G2(점수화 평균치 2.77)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.001$)

2-4. 공장 피관과 장막 제거 공장 피관(Group 1, 2)을 비교하였을 때, 1주차에 두 군 모두 피관과 주변 조직 사이에서 VEGF 발현이 비슷하게 일어났다.

공장 피관과 장막 제거 공장 피관군에서 주변 조직과의 VEGF는 1주차에 서 비슷하게 발현되었으나 유의하지 않았고. 2주차 공장 피관군에서 주변 조직과의 VEGF 발현이 근육 피관보다 유의하게 적게 나타났다. W

표 15. 7일째 Group 1,2 의 VEGF 염색 발현 area density

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	7.1	10.6	10.5	8.6
	1-2	11.2	8.9	7.1	
	1-3	8.1	8.5	5.4	
2	2-1	8.6	6.3	10.2	8.1
	2-2	8.7	6.5	9.2	
	2-3	7.1	8.4	8.6	

표 16. 14일째 Group 1,2 의 VEGF 염색 발현 area density

14days		zone1	zone2	zone3	
1	1-1	11.4	5.9	7.5	6.6
	1-2	9.3	3.6	7.8	
	1-3	5.9	2.6	6.1	
2	2-1	12.2	14.8	12.9	10.2
	2-2	14.5	9	8.5	
	2-3	10.2	5.6	4.6	

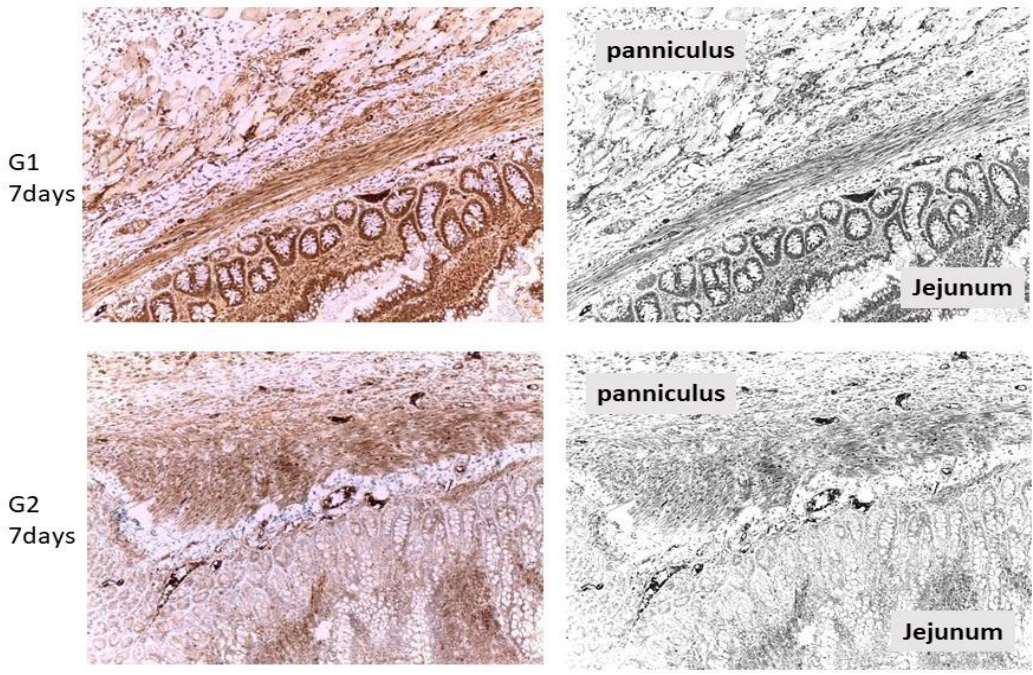


그림 32. 7일째 Group 1,2 의 VEGF 염색 발현 관찰

좌: VEGF 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피관과 장막 제거 공장 피관군의 Panniculus에서 VEGF 발현은 비슷하게 나타났다

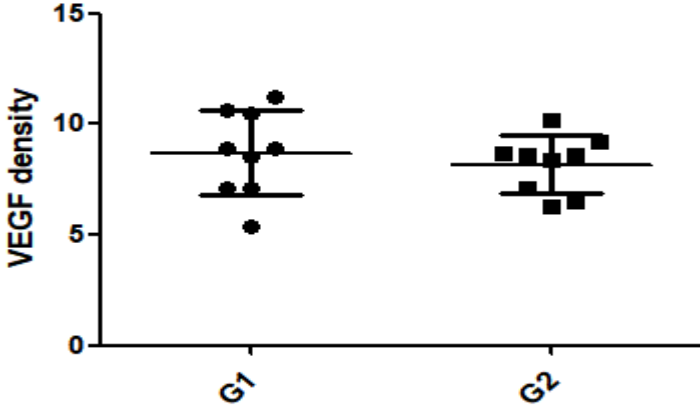


그림 33. 7일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 VEGF 발현을 분석한 결과 G1(밀도 평균치 8.6)은 G2(밀도 평균치 8.1)과 비슷하게 발현되었으나 그 수치는 유의하지 않았다.

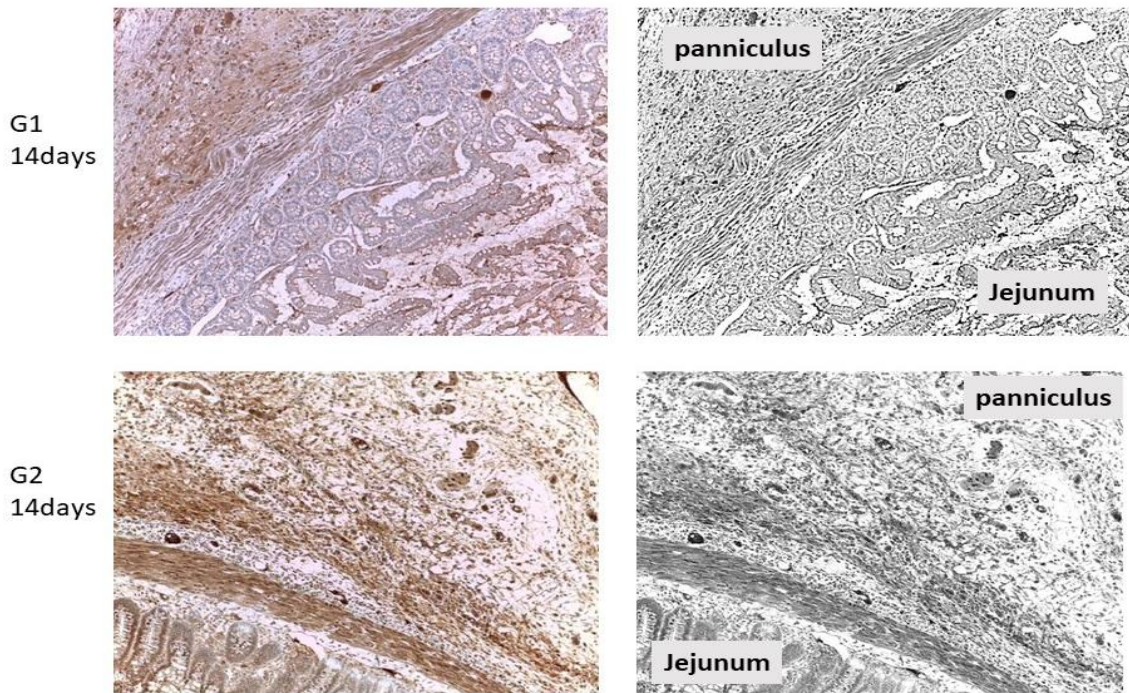


그림 34. 14일째 Group 1,2 의 VEGF 염색 발현 관찰

좌: VEGF 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

2주차 공장 피판군의 Panniculus에서 VEGF 발현이 근육 피판 보다 적게 나타났다.

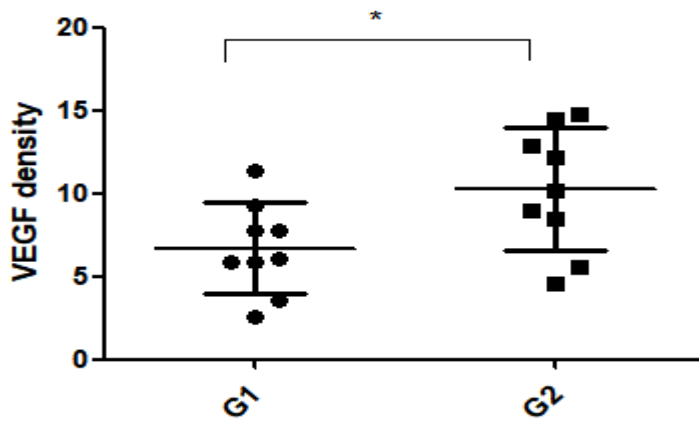


그림 35. 14일째 Group 1,2의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 VEGF 발현을 분석한 결과 G1(밀도 평균치 6.6)은 G2(밀도 평균치 10.2)과 유의하게 적게 발현되었다. ($P < 0.01$)

2-5. 공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 공장 피판의 주변 조직에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

1주차 공장 피판군에서 주변 조직과의 α -SMA 발현이 장막 제거 공장 피판에 비해 유의하게 적게 나타났다. 2주차 공장 피판군에서 주변 조직과의 α -SMA 발현이 장막 제거 공장 피판에 비해 적게 나타났지만 유의하지 않았다.

표 17. 7일째 Group 1,2의 α -SMA 염색 발현 정도 density

7days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	25.6	12.9	16.3	15.4
	1-2	11.6	16.3	16	
	1-3	15.3	12.2	12.9	
2	2-1	23.7	26.5	13.4	24.1
	2-2	33.4	24	25.3	
	2-3	26.4	20.4	24.3	

표 18. 14일째 Group1,2의 α -SMA 염색 발현 정도 density

14days		zone1	zone2	zone3	mean
1	1-1	15.6	11.6	28.1	14.8
	1-2	13.1	14.5	11.1	
	1-3	11.2	13.1	15.5	
2	2-1	21.4	17.3	18.9	21.3
	2-2	17.3	22.9	21.4	
	2-3	22.8	19.7	30.1	

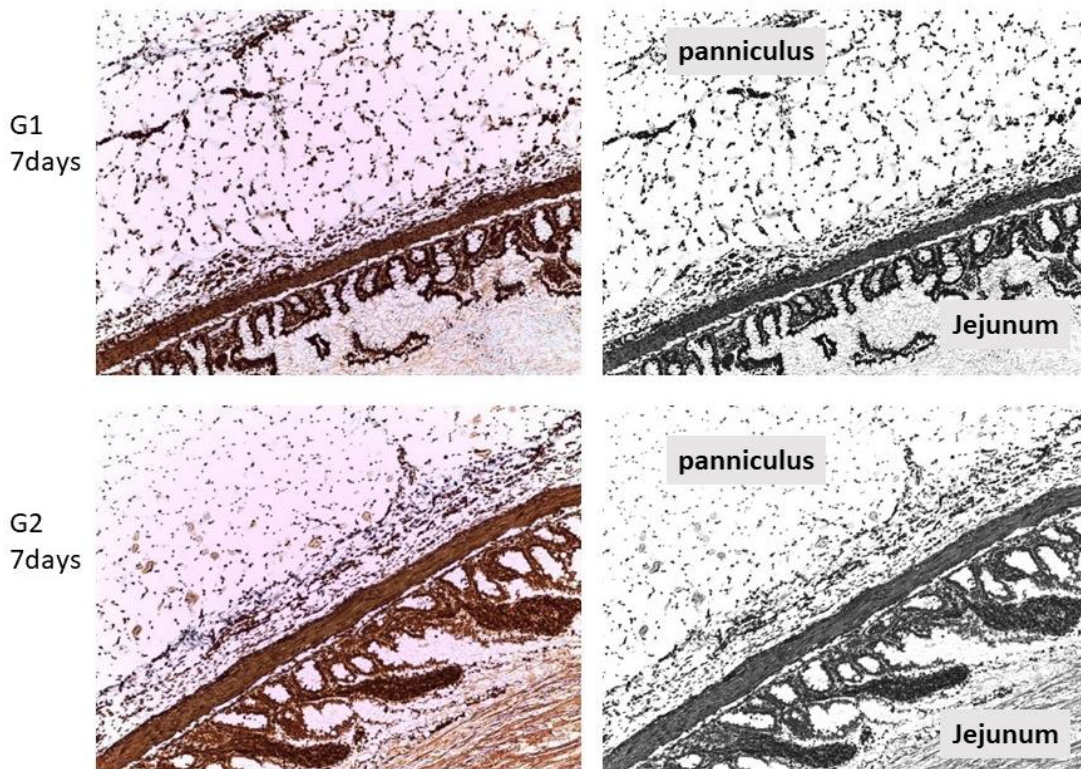


그림 36. 7일째 Group 1,2의 α -SMA 발현 area density 관찰

좌: α -SMA 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피판과 장막 제거 공장 피판(Group 1, 2)을 비교하였을 때 공장 피판의 Panniculus와 피판 사이 경계에서 α -SMA 발현 (갈색부분)이 더 적게 일어났다.

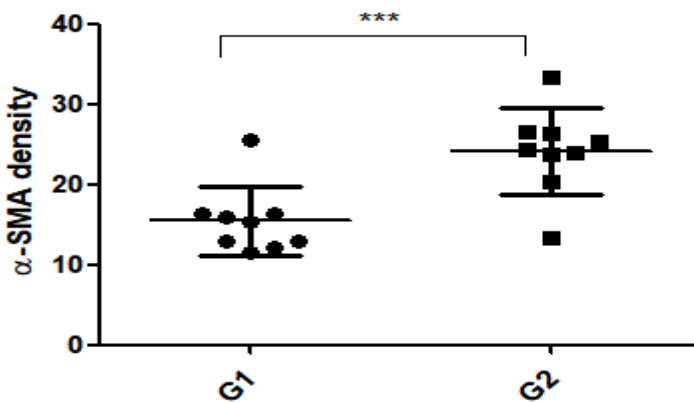


그림 37. 7일째 Group 1,2 의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 α -SMA 분석한 결과 G1(밀도 평균치 15.4)은 G2(밀도 평균치 24.1)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.0001$)

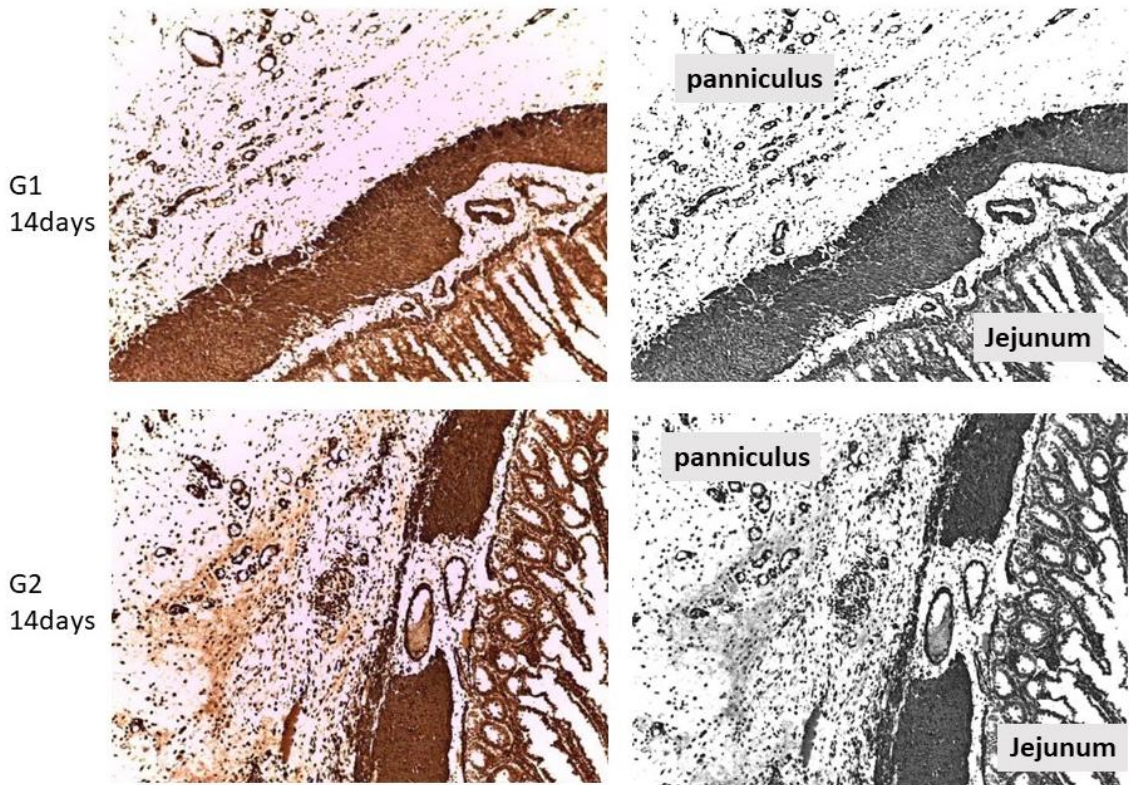


그림 38. 14일째 Group 1,2의 α -SMA 발현 area density 관찰

좌: α -SMA 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

공장 피관과 장막 제거 공장 피관(Group 1, 2)을 비교하였을 때 공장 피관의 Panniculus와 피관 사이 경계에서 α -SMA 발현 (갈색부분) 이 더 적게 일어났다.

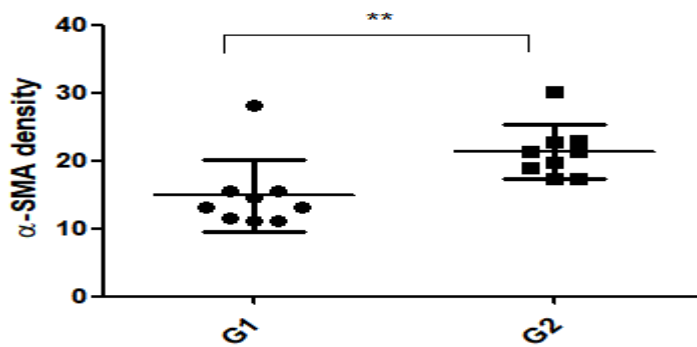


그림 39. 14일째 Group 1,2 의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 α -SMA 분석한 결과 G1(밀도 평균치 14.8)은 G2(밀도 평균치 21.3)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.001$)

3-1. 장막 제거 공장 피관과 근육 피관 (Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피관에서 혈관 생성이 상대적으로 덜 일어났다.

장막을 제거한 공장 피관에서 혈관 신생이 근육 피관에 비해 적게 나타났다. 피관에서 CD 31 염색을 통해 Panniculus와 피관 사이 경계에서 신생 혈관 개수를 비교하였을 때, 장막 제거 공장 피관에서 그 숫자가 유의하게 적었다.

표 19. 7일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수

7days		zone1	zone2	zone3	mean
2	2-1	4	5	4	3.88
	2-2	4	3	4	
	2-3	3	3	5	
3	3-1	6	3	5	5.11
	3-2	7	5	5	
	3-3	7	3	5	

표 20. 14일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 개수

14days		zone1	zone2	zone3	mean
2	2-1	6	2	7	4.8
	2-2	5	5	4	
	2-3	5	4	6	
3	3-1	7	10	5	7
	3-2	10	4	4	
	3-3	8	6	9	

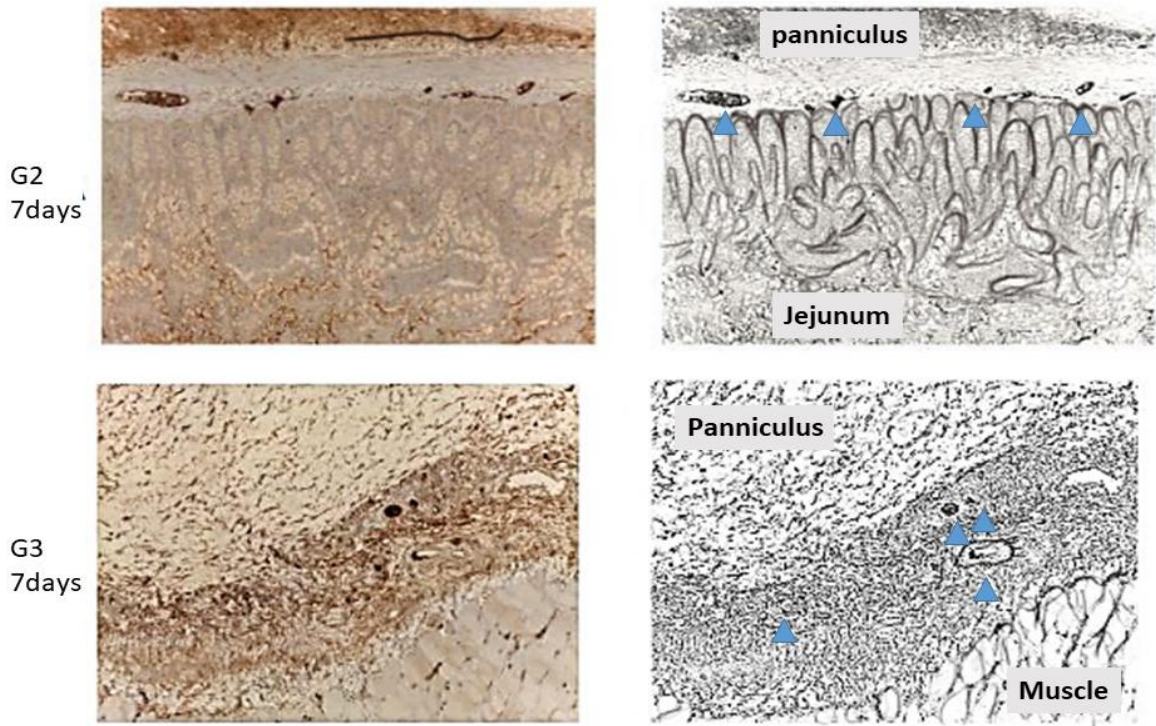


그림 40. 7일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰

좌: CD31 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막 제거한 공장 피관에서 혈관 신생이 근육 피관에 비해 적게 나타났다. (화살표: 혈관)

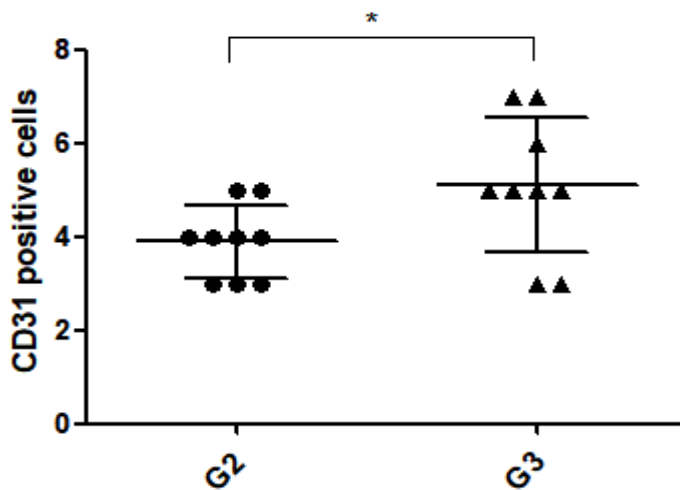


그림 41. 7일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프

CD31 염색을 통해 신생혈관 개수를 분석한 결과 G2(평균치 3.88)는 G3(평균치 5.11)

보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.01)

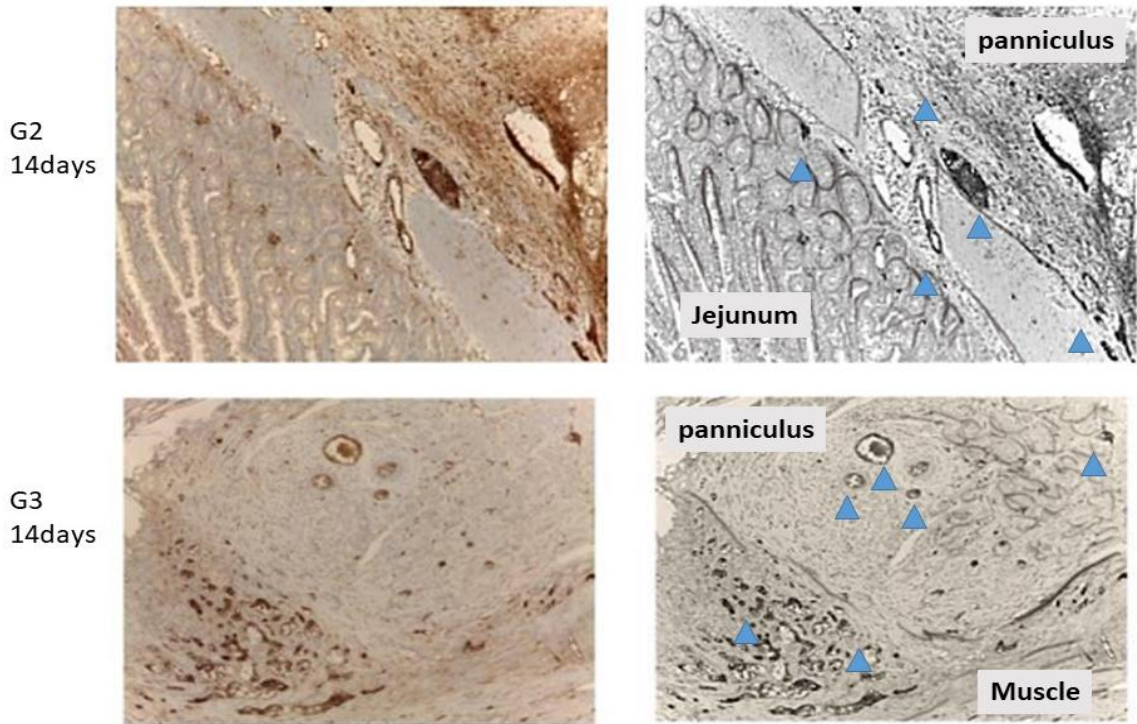


그림 42. 14일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 관찰

좌: CD31 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막을 제거한 공장 피판의 혈관 신생이 근육 피판에 비해 적게 나타났다 (화살표: 혈관)

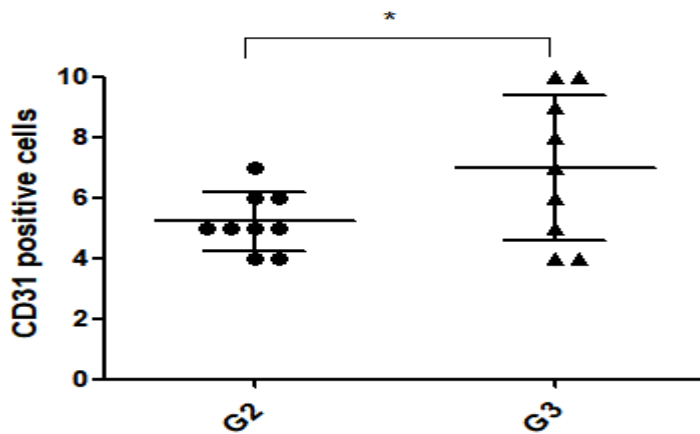


그림 43. 14일째 Group 2,3의 CD31 염색 후 신생 혈관 수 비교 그래프

CD31 염색을 통해 신생혈관 개수를 분석한 결과 G2(평균치 4.8)는 G3(평균치 7)보다 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.01$)

3-2. 장막제거 공장 피판과 근육 피판 (Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피판이 주변 조직과 섬유화가 상대적으로 덜 일어났다.

장막 제거 공장 피판군에서 주변 조직과의 섬유화 정도가 근육 피판에 비해 유의하게 적었다. 1주차 및 2주차 조직 절편의 MT 염색을 통해 주변 조직 사이의 경계를 임의로 지정한 3곳에서 collagen으로 염색된 파란색 부분의 밀도로 확인하였다.

표 21. 7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 fibrosis density

7days		zone1	zone2	zone3	mean
2	1-1	24.2	33	40	31.1
	1-2	33	30.9	32.3	
	1-3	32.8	26	28.1	
3	3-1	25.3	48.5	43.7	37.6
	3-2	34	26.8	41.3	
	3-3	43.7	41.3	34	

표 22. 14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 fibrosis density

14days		zone1	zone2	zone3	
2	1-1	29.2	24.2	35.2	35.7
	1-2	31.1	29.2	48.1	
	1-3	48.1	27.9	49	
3	3-1	42.6	40.9	51.2	47
	3-2	47.2	61.2	43.3	
	3-3	49.5	42.1	45.1	

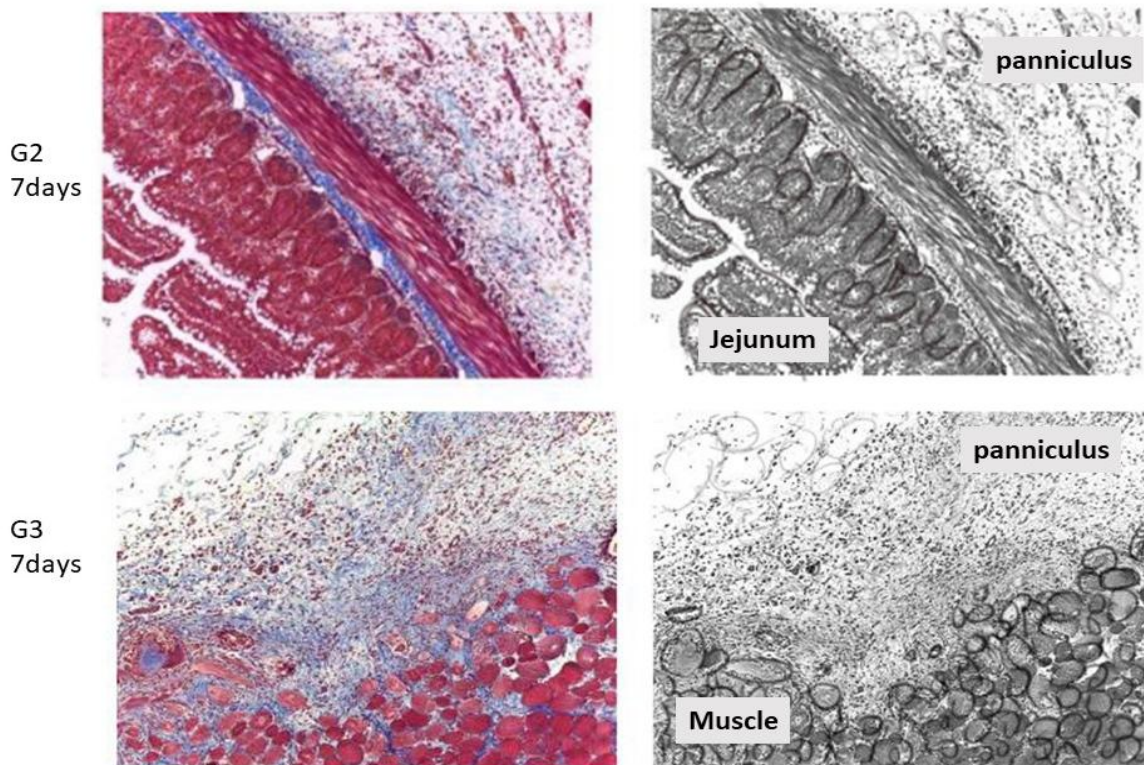


그림 44. 7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰

좌: MT 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막제거 공장 피판과 근육 피판 (Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피판의 Panniculus에서 섬유화가 (파란 부분) 상대적으로 덜 일어났다

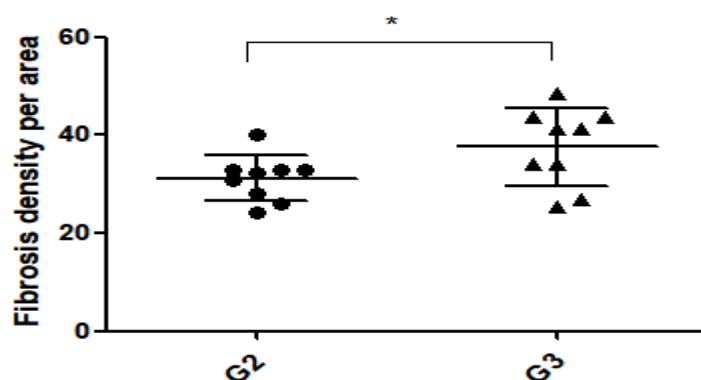


그림 45. 7일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 Collagen 밀도를 분석한 결과 G2(밀도 평균치 31.1)은 G3(밀도 평균치 37.6)보다 유의하게 덜 일어났다. (P < 0.01)

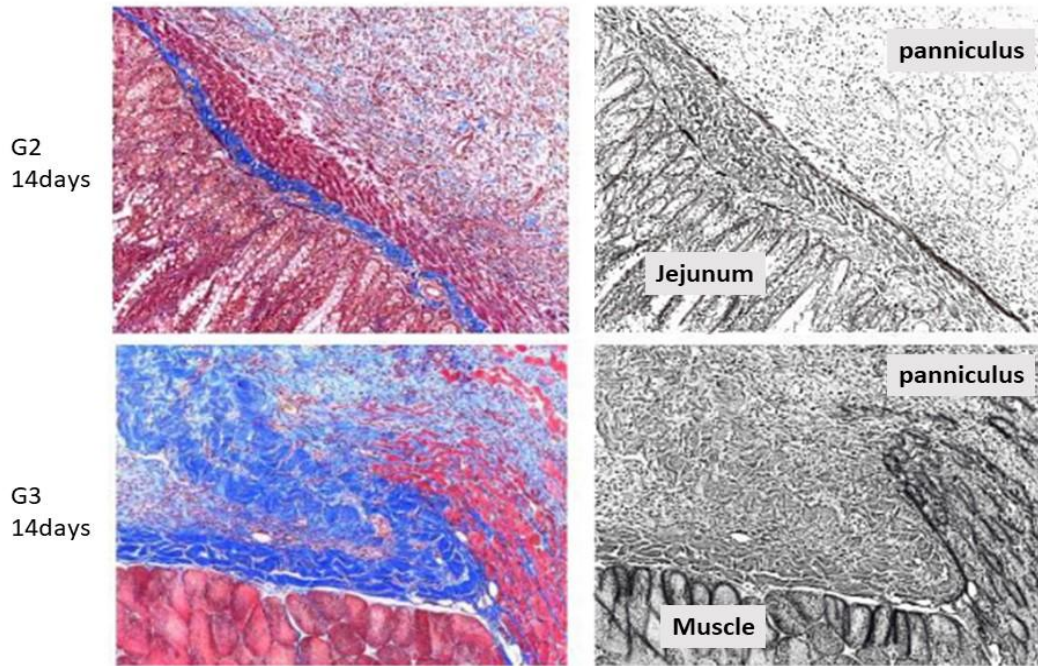


그림 46. 14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis 관찰

좌: MT 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도 모식도

장막제거 공장 피판과 근육 피판 (Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피판의 Panniculus에서 섬유화가(파란 부분) 상대적으로 덜 일어났다

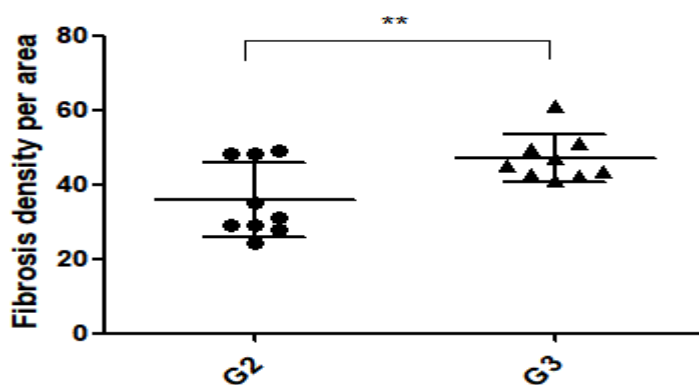


그림 47. 14일째 Group 2,3의 MT 염색 후 Fibrosis area 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 Collagen 밀도를 분석한 결과 G2(밀도 평균치 35.7)은 G3(밀도 평균치 47)보다 유의하게 덜 일어났다. (P < 0.001)

3-3. 장막 제거 공장 피관과 근육 피관 (Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피관의 주변 조직에서 VEGF 발현이 비슷하게 일어났다.

장막 제거 공장 피관군에서 주변 조직과의 VEGF 발현이 근육 피관과 1주차에 유의하게 적게 나타났으나 그 차이가 크지 않았고, 장막 제거 공장 피관군에서 주변 조직과의 VEGF 발현이 근육 피관과 2주차에 비슷하게 발현되었으나 유의하지 않았다.

표 23. 7일째 Group 2,3의 VEGF 염색 발현 area density

7days		zone1	zone2	zone3	mean
2	2-1	8.6	6.3	10.2	8.1
	2-2	8.7	6.5	9.2	
	2-3	7.1	8.4	8.6	
3	3-1	13.4	14.3	7.2	10.6
	3-2	8.3	10.2	13.3	
	3-3	11.4	9.3	8.2	

표 24. 14일째 Group 2,3의 VEGF 염색 발현 area density

14days		zone1	zone2	zone3	
2	2-1	12.2	14.8	12.9	10.2
	2-2	14.5	9	8.5	
	2-3	10.2	5.6	4.6	
3	3-1	9.1	10.3	8.4	10.5
	3-2	14.3	9.8	10.1	
	3-3	12.3	11.2	9.8	

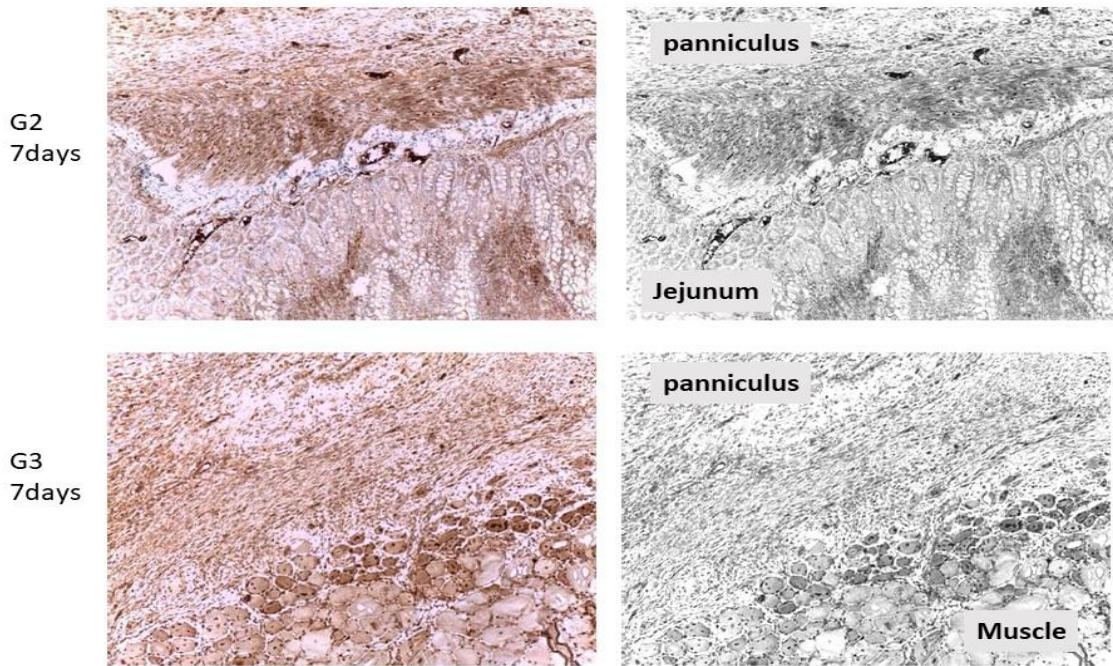


그림 48. 7일째 Group 2,3의 VEGF 발현 area density

좌: VEGF 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막 제거 공장 피관군의 Panniculus에서 VEGF 발현이 근육 피관과 1주차에 유의하게 적게 나타났다

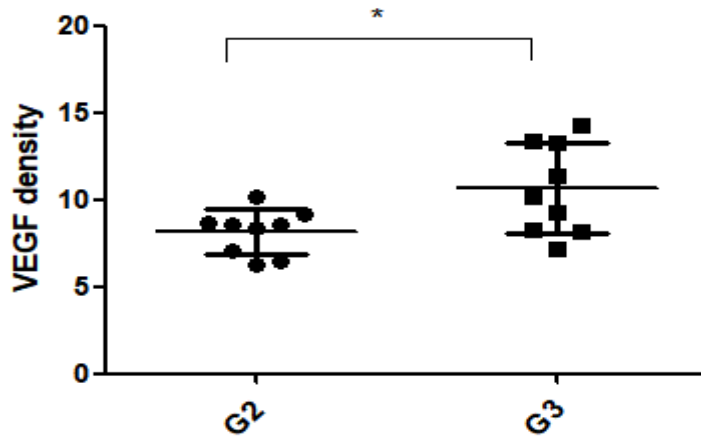


그림 49. 7일째 Group 2,3의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 VEGF 발현을 분석한 결과 G2(밀도 평균치 8.1)은 G3(밀도 평균치 10.6)과 유의하게 적게 발현되었다. (P < 0.01)

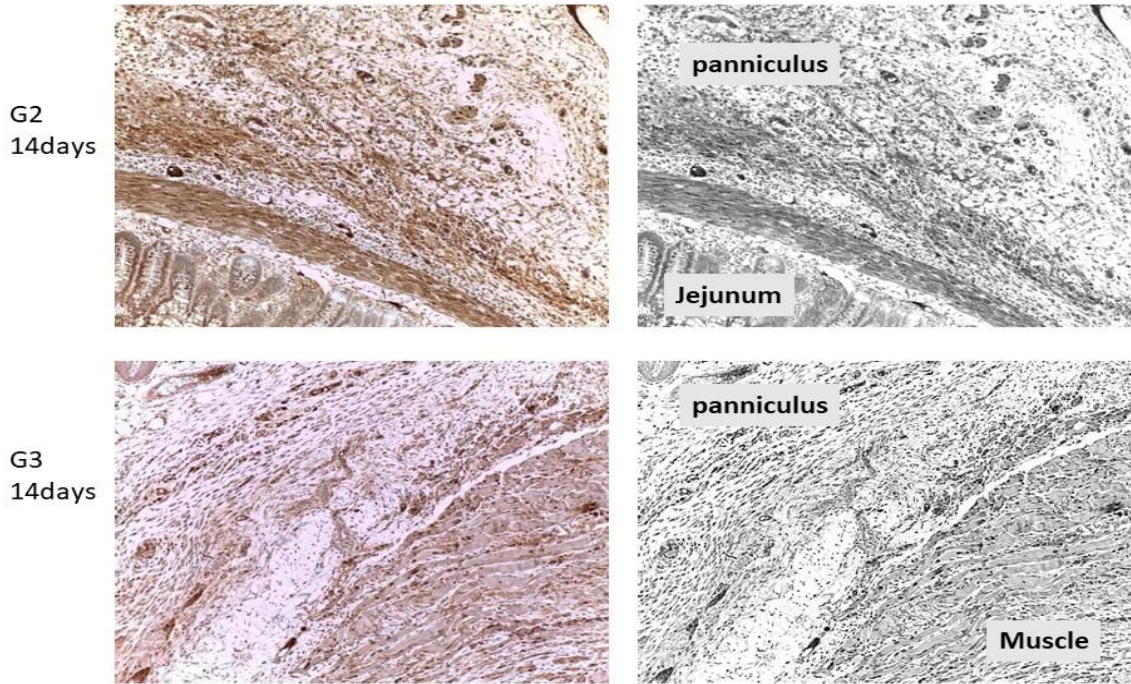


그림 50. 14일째 Group 2,3의 VEGF 발현 area density

좌: VEGF 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막 제거 공장 피판의 Panniculus에서 VEGF 발현이 근육 피판과 2주차에 비슷하나 유의하지 않았다.

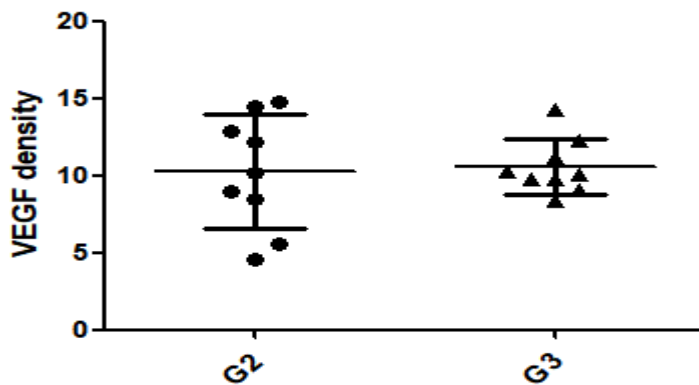


그림 51. 14일째 Group 2,3의 VEGF 염색 발현 density 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 VEGF 발현을 분석한 결과 G2(밀도 평균치 10.2)은 G3(밀도 평균치 10.5)과 발현은 비슷하였으나 수치가 유의하지 않았다.

3-4. 장막 제거 공장 피판과 근육 피판(Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피판의 주변 조직에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

장막 제거 공장 피판군에서 주변조직과의 α -SMA 발현이 근육 피판에 비해 1주차, 2주차 모두 유의하게 적게 나타났다.

표 25. 7일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 density

7days		zone1	zone2	zone3	mean
2	2-1	23.7	26.5	13.4	24.1
	2-2	33.4	24	25.3	
	2-3	26.4	20.4	24.3	
3	3-1	23.3	34.8	33.8	33.2
	3-2	32.8	30.9	42.16	
	3-3	33.9	35.1	32.8	

표 26. 14일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 density

14days		zone1	zone2	zone3	mean
2	2-1	21.4	17.3	18.9	21.3
	2-2	17.3	22.9	21.4	
	2-3	22.8	19.7	30.1	
3	3-1	25.4	23.9	23.3	25.7
	3-2	24.5	21	24.6	
	3-3	37.3	23.6	27.7	

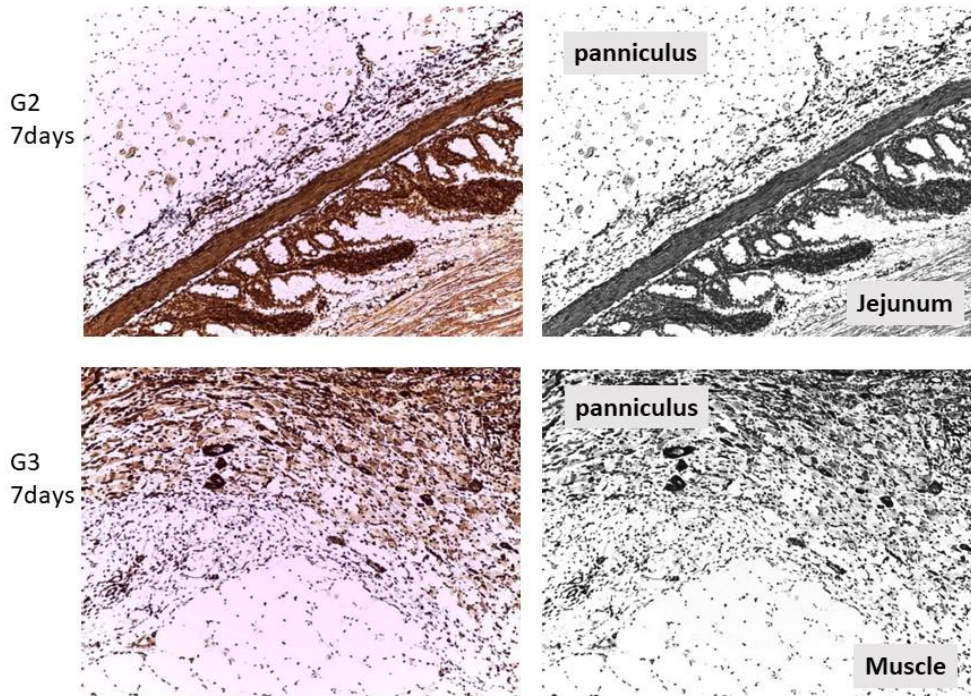


그림 52. 7일째 Group 2,3의 α -SMA 발현 area density 관찰

좌: α -SMA 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막 제거 공장 피관과 근육 피관(Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피관의 Panniculus와 피관 사이 경계에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

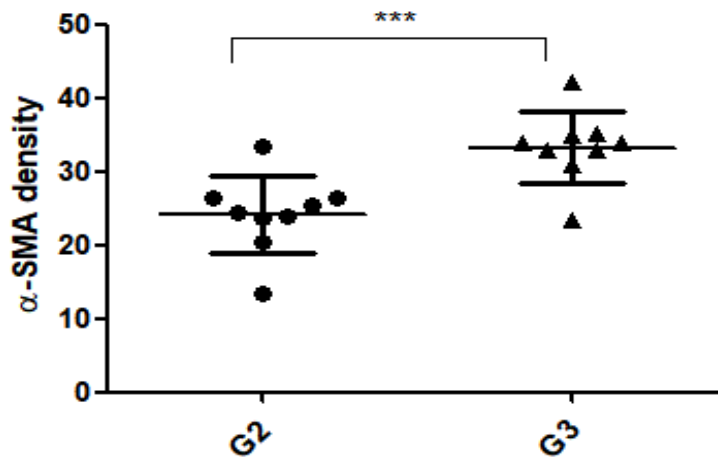


그림 53. 7일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 α -SMA 분석한 결과 G2(밀도 평균치 24.1)은 G3(밀도 평균치 33.2)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.0001)

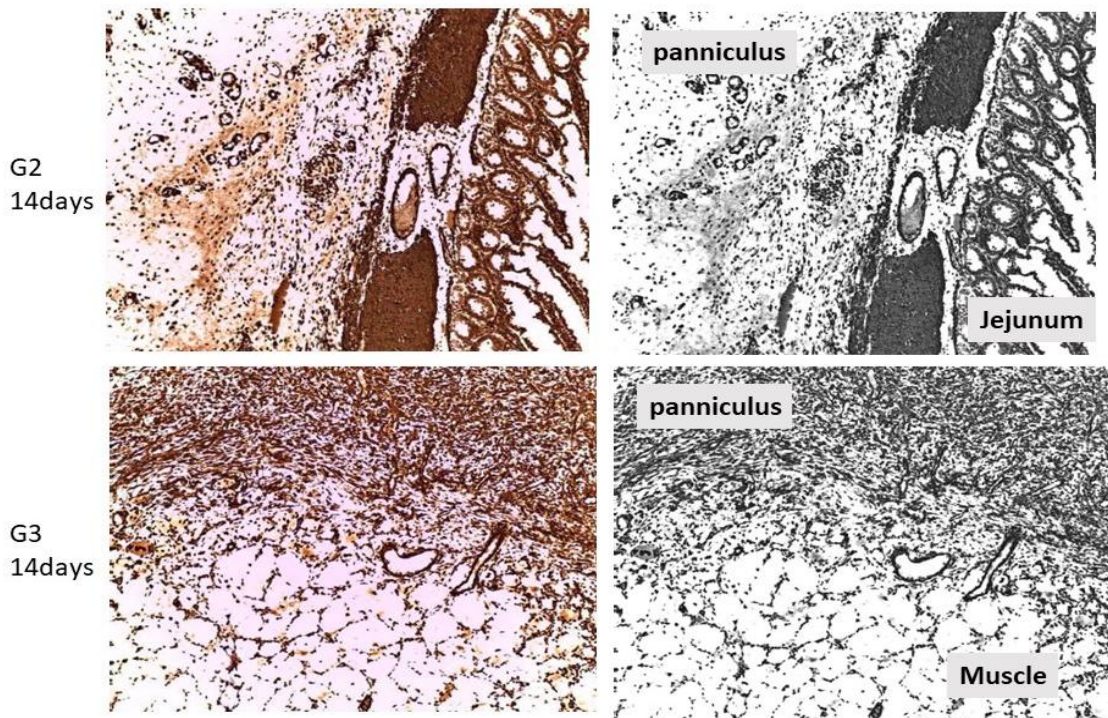


그림 54. 14일째 Group 2,3의 α -SMA 발현 area density 관찰

좌: α -SMA 면역조직화학 염색 (X100), 우: 단순화한 모식도

장막 제거 공장 피판과 근육 피판(Group 2, 3)을 비교하였을 때 장막 제거 공장 피판의 Panniculus와 피판 사이 경계에서 α -SMA 발현이 더 적게 일어났다.

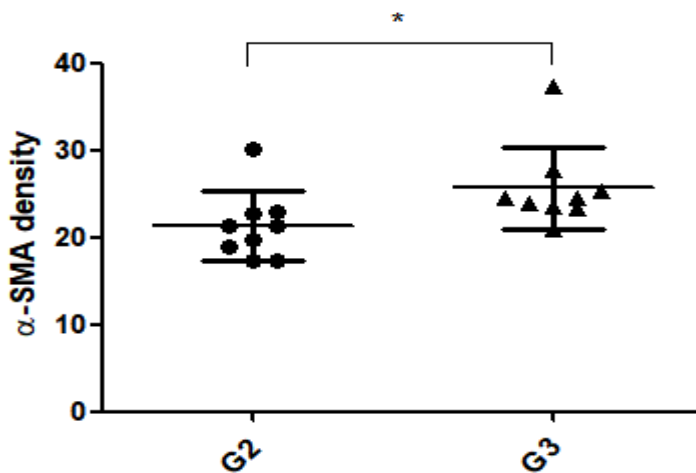


그림 55. 14일째 Group 2,3의 α -SMA 염색 발현 비교 그래프

조직의 Panniculus에서 임의의 3개 구역을 지정하여 α -SMA 분석한 결과 G2(밀도 평균치 21.3)은 G3(밀도 평균치25.7)보다 유의하게 적게 나타났다. (P < 0.01)

고찰

이식 피관에 있어서 처음에 혈관경(pedicle)에서 공급받는 혈액으로 생존하던 피관은, 주변 조직과의 새로운 혈관 생성이 진행됨에 따라 혈관경에 큰 구애 받지 않고 생존 할 수 있게 된다.^{18,19} 근육 피관과 피부 피관 이식의 경우, 옮겨진 후 약 10-14일 이내에 혈관경을 안전하게 나눌 수 있음이 입증되었다.^{9,10,20,21}

그러나 유리 공장 피관은 이들과 달리 외경이 장막(serosa)으로 둘러싸여 있다. 장막은 두가지 층으로 구성되어 있고, 상피 세포층으로서 본래 유효성의 액체를 분비하여 장의 유착을 방지하고 마찰을 감소시키는 역할을 한다. 이 장막이 공장 피관으로의 혈관 신생을 저해하여 다른 피관과 달리 피관경에 의존하는 시기가 연장될 것이라는 가설이 있다.⁷

유리 공장 피관 수술 후, 2차 수술 혹은 감염, 우발적 사고 후 혈관경에 손상을 입혀, 결국 피관이 손실되는 경우는 드문 경우지만 종종 보고 되고 있다.^{13,14,15,16} 이와 같은 경우를 대비하여, 공장 피관의 분할(division) 가능 시기를 아는 것도 중요하지만, 공장 피관의 생착이 빠르고 안전하게 될 수 있도록 하는 노력 또한 필요하다.

실제로 다수 논문에서 피관의 주변 혈관 신생의 척도인, 혈관경(pedicle)을 분할(division)해도 생존 할 수 있는 시기가, 유리 공장 피관의 경우 다른 근육 피관이나 근막-피부 피관, 골 피관에 비하여 늦다는 문헌 고찰을 통한 연구가 있다.¹ 또한 다른 문헌에서, 공장 이식편은 여러 다른 층 (점막, 점막 하, 근육 및 장막)으로 구성된 복합 조직 이식편이기 때문에, 또한 장간막 혈관(mesentery a,v)에서 단일 혈액 공급을 받는 구조이기 때문에, 혈관 재생이 더 오래 걸리거나 주변 조직으로 전혀 발생하지 않을 수 있다고 보고 된다.^{9,10,16,18,19}

공장 피관의 serosa(장막)층이, 장의 신생 혈관 형성을 실제로 방해할 수 있음을 시사하는 연구가 있다.^{8,17} Cohen et al.²³ 는 쥐의 복부에서 장의 피하 이식 실험 후 30일째에 혈관을 절단하고 장의 생착률(acceptance rate)을 연구했다. 하지만, 이러한 선례 연구들은 공장 피관의 생착 유무만을 보고 하였고, 실제 면역 조직학적 염색을 통한 관찰과, 정량화된 계측 보고는 없었다. 따라서 이번 연구는 이와 같은 문제들을 조직 면역학적 염색을 통한 관찰을 통해 알아 보고자 하였다.

이번 연구를 통해 다음과 같은 결과들을 얻을 수 있었다.

공장 피관과 근육 피관 (Group 1, 3)을 비교하였을 때, 공장 피관의 주변 조직과의 혈관 신생이 CD31 분석상, 근육 피관에 비해 유의하게 적게 나타났다. (1주차: $P < 0.0001$, 2주차: $P < 0.0001$) 또한 주변 조직으로 섬유화(fibrosis)도 유의하게 적게 나타났다. (1주차: $P < 0.001$, 2주차: $P < 0.0001$) VEGF는 1주차에서 두 그룹 간의 발현이 큰 차이를 보이지 않았고 2주차에서는 적게 발현되는 것을 볼 수 있었다. (1주차: $P < 0.001$, 2주차: $P < 0.01$) α -SMA로 wound repair 정도를 비교했을 때, 공장 피관에서 유의하게 적게 발현되었다. (1주차: $P < 0.0001$, 2주차: $P < 0.01$) 이로부터 근육 피관과 비교하여, 공장 피관은 주변 조직과의 생착 기간이 느리다는 것을 알 수 있다.

공장 피관과 장막 제거 공장 피관 (Group 1, 2)을 비교하였을 때, 장막을 제거한 이식 피관에서 공장의 생착 정도가 더 양호하다고 평가할 수 있었다. CD31 분석을 통해 serosa(장막) 제거군에서 유의하게 더 많은 신생 혈관 분포를 관찰할 수 있었다. (1주차: $P < 0.001$, 2주차: $P < 0.0001$) 또한 장막을 제거한 이식 피관에서 주변조직으로 섬유화(fibrosis)도 유의하게 많이 됨을 관찰할 수 있었다. (1주차: $P < 0.001$, 2주차: $P < 0.01$) PAS 염색을 통한 용모 크기(villous height)를 비교 평가하여 점수화 하였을 때, 장막 제거 공장 군에서 더욱 풍부한 술잔 세포(goblet cell)과 더 높은 크기의 용모(villous)를 관찰 할 수 있었다. (1주차: $P < 0.0001$, 2주차: $P < 0.001$) VEGF는 1주차에서 두 군에서 모두 비슷하게 발현되었으나 그 수치는 유의하지 않았고 2주차에서는 공장 피관군이 장막 제거 공장 피관군에 비해 유의하게 적게 나타났다. ($P < 0.01$) α -SMA로 wound repair 정도를 비교했을 때, 공장 피관에서 유의하게 적게 발현되었다. (1주차: $P < 0.0001$, 2주차: $P < 0.001$) 이로부터 공장의 가장 외측에 주변 장기와의 분리 역할을 하는 이 장막은 공장이 이식 될 때 일종의 장벽으로 작용할 수 있음을 시사한다.

장막 제거 공장 피관과 근육 피관(Group 2, 3)을 비교하였을 때, 장막 제거 공장 피관은 근육 피관 보다 혈관 생성이 유의하게 덜 일어났다. 장막 제거 공장 피관의 주변 조직과의 혈관 신생이 CD31 분석을 통해, 근육 피관에 비해 유의하게 덜 나타났음을 알 수 있었다. (1주차: $P < 0.01$, 2주차: $P < 0.001$) 또한 주변 조직으로 섬유화(fibrosis)도 유의하게 적게 나타났다. (1주차: $P < 0.01$, 2주차: $P < 0.001$) VEGF는 1주차에 장막 제거 공장군이 근육 피관에 비해 적게 발현되기는 하였으나 그 차이가 적었고, 2주차에서는 비슷하게 발현되었으나 그 수치가 유의하지 않았다. α -SMA로 wound repair 정도를 비교했을 때, 공장 피관에서 유의하게 적게 발현되었다. 그러나 2주차에서는 그 발현이 비슷해졌다. (1주차: $P < 0.0001$, 2주차: $P < 0.01$) 이로부터 장막을 제거하더라도 공장 피관은 근육 피관에 비하여 주변 조직과의 생착이 느리다는 것을 알 수 있다.

공장 피관군, 장막 제거 공장 피관군과 근육 피관군(Group 1, 2, 3)에서 섬유화 정도, 관류량 정도, 신생 혈관의 생성 및 상처 재생 정도를 비교하였을 때 근육 피관군, 장막 제거 공장 이식군, 공장 이식군의 순서로 유의하게 나타났다.

Masson's trichrome 염색을 통해 3군에서의 collagen의 분포를 관찰 및 비교를 진행하였고 이는 섬유화(fibrosis)가 되어지는 정도를 보여주며 이를 통해 생착(acceptance) 정도를 평가할 수 있다. 그 결과 섬유화 정도는 근육 피관군이 제일 많고, 장막 제거 공장 피관군 다음 공장 피관군의 순서로 유의하게 나타났다.

PAS 염색을 통해 3군에서 용모 높이를 측정 및 비교하였고, 이는 간접적으로 피관의 관류량을 보여줄 수 있다. 그 결과 관류량 정도는 근육 피관군이 제일 많고 장막 제거 공장 피관군 다음 공장 피관군의 순서로 유의하게 나타났다.

CD31 면역조직화학 염색을 통해 3군에서 신생 혈관의 개수 측정에서도 근육 피관군이 제일 많고 장막 제거 공장 피관군 다음 공장 피관군의 순서로 유의하게 나타났다.

α -SMA 면역조직화학 염색에 나타나는 α -SMA는 미오세포(myofibroblast)와 북형간충질세포(spindle shaped mesenchymal cell)에서 발견되는 것으로, 이는 상처 치유(wound healing) 과정에서 필요한 세포 외 기질의 구축에 있어서 핵심적인 역할을 한다. 3군에서의 α -SMA발현 측정 및 분석을 한 결과 근육 피관군이 제일 많고 장막 제거 공장 피관군 다음 공장 피관군의 순서로 유의하게 나타났다.

VEGF 면역조직화학 염색을 통해 내피세포의 성장과 혈관의 신생에 영향을 주는 인자의 발현을 측정 분석하였으나 이는 일관된 결과를 나타내지 않았다.

본 실험에서는 피관의 주변 조직과의 혈관 생성 정도, 생착(acceptance) 정도, 관류량(perfusion) 정도를, 단순히 피관의 생존 여부로 판단하지 않고, 이를 조직 세포면역학적인 접근을 통해 객관적으로 분석하였다.

공장 피관이 다른 피관과 다른 점으로, 피관을 둘러싸는 serosa(장막)가 있어서 주변 혈관신생(neovascularization)에 방해물로서 영향을 끼칠 수 있음을 파악하였다. 장막 제거 공장 피관이, 장막 비제거 공장 피관에 비해 유의하게 좋은 생착 정도를 보였다. 하지만 장막 제거 피관과 근육 피관을 비교하였을 때, 그 생착률에 근육 피관보다는 유의하게 떨어짐을 보였다. 이는 여러가지 이유가 있고, 한가지는 장막을 온전히 전부 제거하지 않은 점도 있다고 생각된다.

이번 실험을 토대로 추후 실제 임상에서 공장 피관의 장막을 부분적으로 제거 후 피관을 이전하거나 혹은 장막의 영향을 숙지 하고 이에 다른 처리를 통해, 피관의 빠르고 안전한 생착에 더 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 장막이 물리적인 장벽으로 작용하여 생착과 혈관 생성에 영향을 끼치는지, 화학적으로 분비하는 물질에서 영향을 끼치는지는 후속 연구가 필요할 것으로 생각 된다. 장막을 채취하여 근육 피관(muscle flap)에 고정 후 이식하여 그 혈관 생성 정도를 보는 것도 하나의 추가적인 연구가 될 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. Azdan SN, Albornoz CR, Matros E, Paty PB, Cordeiro PG. Free jejunal flap for pharyngoesophageal reconstruction in head and neck cancer patients: an evaluation of donor-site complications. *J Reconstr Microsurg.* 2015;31(9):643-646.
2. Okazaki M, Asato H, Okochi M, Suga H. One-segment double vascular pedicled free jejunum transfer for the reconstruction of pharyngoesophageal defects. *J Reconstr Microsurg.* 2007;23(4):
3. Nakatsuka T, Harii K, Asato H, Ebihara S, Yoshizumi T, Saikawa M. Comparative evaluation in pharyngo-oesophageal reconstruction: radial forearm flap compared with jejunal flap. A 10-year experience. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1998;32(3):307-310.
4. Nakatsuka T, Harii K, Asato H, et al. Analytic review of 2372 free flap transfers for head and neck reconstruction following cancer resection. *J Reconstr Microsurg.* 2003;19(6):363-368; discussion 369.
5. Nakatsuka T, Harii K, Asato H, et al. Analytic review of 2372 free flap transfers for head and neck reconstruction following cancer resection. *J Reconstr Microsurg.* 2003;19(6):363-368; discussion 369.
6. Numajiri T, Sowa Y, Nishino K, et al. Double vascular anastomosis in the neck for reliable free jejunal transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2010;48(7):511-514.

7. Yoon AP et al. Critical Time for Neovascularization/Angiogenesis to Allow Free Flap Survival after Delayed Postoperative Anastomotic Compromise without Surgical Intervention: A Review of the Literature. *Microsurgery*. 2016 Oct;36(7):604-612
8. Yano K, Hata Y, Matsuka K et al. Experimental study of subcutaneously transferred intestine: Effect of the presence of serous membrane on acceptance rate. *J Reconstr Microsurg*. 1993 Jan;9(1):19-25
9. Tsur H, Daniller A, Strauch B. Neovascularization of skin flaps: Route and timing. *Plast Reconstr Surg*. 66: 85, 1980.
10. Serafin D, Shearin JC, and Georgiade NG. The vascularization of free flaps: A clinical and experimental correlation. *Plast Reconstr Surg*, 60: 233, 1977
11. Nahai F, Stahl RS, Hester TR, Clairmont AA. Advanced applications of revascularized free jejunal flaps for difficult wounds of the head and neck. *Plast Reconstr Surg*. 1984;74(6):778-782.
12. Coleman JJ, 3rd, Tan KC, Searles JM, Hester TR, Nahai F. Jejunal free autograft: analysis of complications and their resolution. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(4):589-595; discussion 596-598.
13. Kurita T, Kubo T, Tashima H, Fujii T. Free jejunal flap transfer with multiple vascular pedicles for safe and reliable pharyngoesophageal reconstruction. *Head Neck*. 2018 Oct;40(10):2210-2218

14. Hsieh MH, Yang YT, Tsai YJ, Kuo YR, Lin PY. Comparison of the outcomes of free jejunal flap reconstructions of pharyngoesophageal defects in hypopharyngeal cancer and corrosive injury patients. *Microsurgery*. 2017;37(6):552-557.
15. Razdan SN, Alborno CR, Matros E, Paty PB, Cordeiro PG. Free jejunal flap for pharyngoesophageal reconstruction in head and neck cancer patients: an evaluation of donor-site complications. *J Reconstr Microsurg*. 2015;31(9):643-646.
16. Jones NF, Kuzon, W. M. Jr., Shestak, K. C., and Roth. A. G. Use of fluorescein to predict survival of a free jejunal transfer after disruption of the arterial pedicle on postoperative day 12. *Br J Plast Surg*. 1994, 47:375
17. Yano K, Hata Y, Matsuka K et al. Experimental study of subcutaneously transferred intestine: Effect of the presence of serous membrane on acceptance rate. *J Reconstr Microsurg*. 1993, 9: 19
18. Fisher J. Survival of transferred intestinal segments after vascular pedicle interruption (Discussion). *Plast Reconstr Surg*. 1987, 79: 616
19. Keen M. Arena S. Urken M. Survival of transferred intestine after interruption of blood supply (Letter). *Plast Reconstr Surg* 1987, 80: 750
20. Hirase Y, Valauri FA, Buncke HJ. Neovascularized bone, muscle, and myosseous free flaps: An experimental model. *J Reconstr Microsurg*. 1988, 4: 209

21. Serafin D, Shearin JC, Georgiade NG. The vascularization of free flaps: A clinical and experimental correlation. *Plast Reconstr Surg*. 1977, 60: 233
22. Karakida K, Aoki T, Ota Y, Yamazaki H, Otsuru M, Takahashi M, Sakamoto H, Miyasaka M. Analysis of risk factors for surgical-site infections in 276 oral cancer surgeries with microvascular free-flap reconstructions at a single university hospital. *J Infect Chemother*. 2010 Oct;16(5):334-9
23. Cohen BE, Barrera A: Survival of transferred intestinal segments after vascular pedicle interruption. *Plast Reconstr Surg* 1987, 79:610
24. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY, DiResta GR, Reuter VE. The timing and nature of neovascularization of jejunal free flaps: an experimental study in a large animal model. *Plast Reconstr Surg*. 1999 Jun;103(7):1893-901

영문 요약

Jejunal flap transfer has been widely used in reconstructing hypopharynx and esophagus due to its reasonable success rate, low complication rate, and excellent functional roles^{1,2,3,4,5,6,7}

Most free flaps including muscle, fascia, and bone flaps, becomes independent from the original vascular pedicle as neoangiogenesis develops from the recipient tissue. In contrast, a jejunal flap graft is surrounded along the outer diameter by serosa. The serosal membrane consists of two layers of mesoderm that secretes the intestinal fluid, the inner epithelium and mesothelium. It is known to protect the intestine and to minimize friction, like other organ-surrounding membranes like pericardium and pleura.^{20,21} This squamous epithelial cell layer would inhibit angiogenesis from the recipient bed into the flap and prolong the dependent period on the flap pedicle, unlike other flaps.^{8,9,10}

Many studies have been conducted on the duration of pedicle dependence of a flap by investigating on flap survival after pedicle division to show the rate and degree of neoangiogenesis. It has been reported that the critical period for flap survival depending on the pedicle ranges from 8.5 to 20.1 days, and the period is shortest for skin, bone, and muscle flaps than a jejunal free flap.

The hypotheses of this experimental study are summarized as the following:

Hypothesis 1. Comparing the jejunal and muscle flaps shows the difference in angiogenesis. The angiogenesis of the jejunal flap is relatively slower.

Hypothesis 2. Partial removal of the serosa from the jejunum results in faster angiogenesis than in the untreated jejunal flap.

Hypothesis 3. The serosa-removed jejunal flap group shows comparable rate and degree of angiogenesis as the muscle flap group.

An experiment was conducted on eight-weeks old 300-g white Sprague-Dawley rats. A total of 18 subjects were divided into three groups of 6 animals each. There was a group 1 in which the jejunal flap segment with intact serosa was transferred, a group 2 where the transfer was performed after partial area of serosa was removed from the jejunum, and a group 3 where a 1X1 cm² of anterior rectus abdominis fascia was removed, mimicking a muscle flap model.

Degree of angiogenesis was evaluated by measuring the number of newly formed blood vessels through CD31 immunohistochemistry, and the degree of jejunum perfusion was indirectly evaluated by measuring the villous height through PAS staining. The degree of fibrosis was measured through Masson's trichrome staining to identify adhesion to surrounding tissues. The alpha-SMA immunohistochemistry was performed to show degree of tissue repair. Finally, the immunochemical staining of VEGF represented to explain the differences from the molecular-chemical level

Comparison between the jejunal and muscle flaps (Groups 1 and 3) demonstrated that angiogenesis with the surrounding tissues was lower in the jejunal flaps than in the muscle flaps. Furthermore, there was less fibrosis and less tissue repair in jejunal flaps.

Comparison between the intact jejunal flap and serosa-removed jejunal flaps (Groups 1 and 2), villous height was longer in the serosa-removed jejunum, which indirectly suggests that perfusion and metabolism was more robust in the serosa-removed jejunum. Removal of the serosa in the jejunal flap facilitated angiogenesis with the surrounding tissues. A denser distribution of newly formed blood vessels was observed through CD 31 immunohistochemistry. Furthermore, more collagen and adhesion to the surrounding tissues was observed in the transferred flap with the serosa removed by MT staining.

In conclusion, this study confirmed that jejunal flap has slower neoangiogenesis compared to muscle flap, and partial removal of serosa could facilitate angiogenesis and tissue repair, at least partly. However, the rate and degree of serosa-removed jejunum did not reach the level of muscle flap. This experiment differs from previous ones in that it objectively showed the degree of angiogenesis, adhesion, and perfusion of a transferred flap and the surrounding tissue through animal experiment, and not by clinical judging. It might contribute to better understanding of physiology and the process of flap “take” of a jejunal flap. Follow up studies are required to understand whether serosa’s impact on flap engraftment is due to physical or chemical secretive substances.