보툴리눔 독소의 기니픽 위 전정부 윤상근에 대한 기계적 및 전기 생리학적인 연구

연세대학교 대학원
의 학 과
박 정 호

보툴리눔 독소의 기니픽 위 전정부 윤상근에 대한 기계적 및 전기 생리학적인 연구

지 도 교 수　　박　효　진

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2009년 12월

연세대학교 대학원

의학과

박정호

박정호의 박사 학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2009년 12월

감사의 글

학회에서나 학교에서나 너무나 많은 기회를 주시고 본 논문을 세심하게 지도해주신 박효진 교수님께 진심으로 감사 드리며 힘든 실험 불평 한번 없이 너무나 애써주신 최은주님께 머리 숙여 감사의 말씀 드립니다. 그리고 언제나 아낌없이 성원해주시는 부모님 그리고 처 이성원, 딸 상은, 아들 상민에게도 이 자리를 빌어 고마움을 전합니다.

2009년 11월 4일

저자 씀

<차 례>

국문요약 …… 1

Ⅰ. 서론 …… 3

Ⅱ. 재료 및 방법…… 6

1. 위 전정부 윤상근 절편제작…… 6

2. 보툴리눔 독소의 주입 방법 - 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구 …… 7

3. 장력 측정 방법…… 8

4. 조직학적 검사 …… 9

5. 통계학적 분석 …… 9

Ⅲ. 결과

1. BTX-A 농도에 따른 근수축력의 변화 …… 10

2. 고농도 K^+ 첨가 시 BTX-A에 의한 근수축력의 변화…… 12

3. 전장자극 (electrical field stimulation)시 L-NAME, BTX-A에 의한 근수축력의 변화 …… 13

4. Acetylcholine (Ach) 첨가 시 L-NAME, BTX-A에 의한 근수축력의 변화 ····· 15

5. BTX-A 농도와 시간 경과 에 따른 근수축력의 변화 - 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구 ····· 16

6. 기니픽 위 전정부에 BTX-A 10U 주입 24 시간 및 48시간 경과 하였을 때의 조직반응····· 18

Ⅳ. 고찰 ····· 19

Ⅴ. 결론 ····· 25

참고문헌 ····· 27

영문 요약 ····· 33

그림 차례

그림 1. BTX-A에 의한 근수축력의 변화 ····· 11

그림 2. 고농도 K^+ 추가 시 BTX-A 에 의한 근수축력의 변화 ····· 13

그림 3. 전장자극 (electrical field stimulation)시 L-NAME, BTX-A에 의한 근수축력의 변화 ····· 14

그림 4. Acetylcholine (Ach) 추가 시 L-NAME와 BTX-A 에 의한 근수축력의 변화 ····· 16

그림 5. BTX-A 농도와 시간 경과 에 따른 수축력의 변화 - 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구 ····· 17

그림 6. 기니픽 위 전정부에 BTX-A 10U 주입 24 시간 및 48시간 경과 하였을 때 나타나는 조직반응 ····· 18

<국문요약>

보툴리눔 독소의 기니픽 위 전정부 윤상근에 대한 기계적 및 전기 생리학적인 연구

Botulinum toxin type A(BTX-A)는 강력한 독성을 지닌 물질이나, 전신 부작용 없이 국소적으로 사용할 수 있기 때문에 근육경직(spastic disorder)을 특징으로 하는 여러 임상 질환의 치료에 사용되고 있다. BTX-A에 의한 근이완작용은 BTX-A가 신경말단에 작용하여 근육신경이음부로 acetylcholine(Ach)이 분비되는 것을 억제하기 때문인데, BTX-A는 Ach이 담겨있는 소포(vesicle)가 신경세포막에 융합될 때 이를 매개하는 단백질인 SNAP-25를 분해하여 Ach의 분비를 억제하게 된다. 그러나 최근 연구에 의하면 고농도의 BTX-A에 평활근 조직을 장시간 배양하게 되면 신경 활성을 억제한 후에도 BTX-A농도에 비례하여 근수축력이

감소된다는 또 다른 기전의 가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구는 고농도의 BTX-A가 신경억제 작용과 함께 근육세포에 직접 작용하여 억제효과를 나타내는 지 알아보고 이러한 결과가 실제 동물 실험에서도 나타나는지, 또한 시간에 따른 작용기전의 변화는 없는지를 알아보고자 하였다. 근육절편을 BTX-A 10U에 반응 시킨 후 전장자극, acetylcholine, 고농도 K^+를 첨가하였을 때 근수축의 직접억제 효과가 나타났으며, 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구에서도 BTX-A 주입 24 및 48시간 경과 후 고주파수의 전장자극에 근수축이 직접 억제되는 결과를 보였다. 이상의 결과로 보았을 때 고농도의 BTX-A는 근수축의 직접억제 효과가 있으며 이런 효과는 적어도 48시간 동안 지속됨을 알 수 있었다.

핵심이 되는 말: 보톡스(BTX-A; botulinum toxin A), 전장자극, 위 전정부, 근수축

보툴리눔 독소의 기니픽 위 전정부 윤상근에 대한 기계적 및 전기 생리학적인 연구

<지도교수 박효진>

연세대학교 대학원 의학과

박 정 호

Ⅰ. 서 론

Botulinum toxin은 강력한 독성을 지닌 물질이나, 전신 부작용 없이 국소적으로 사용할 수 있기 때문에 근육경직(spastic disorder)을 특징으로 하는 여러 임상 질환, 즉 사시(strabismus), 반얼굴연축(hemifacial spasm), 눈꺼풀연축(blepharospasm), 아칼라지아(achalasia) 그리고 피부주름 (skin wrinkles)등의 치료에 사용되고 있다. Botulinum toxin은 A부터 G까지 7가지 아형이 있으며,[1] 각각 세포내 표적(intracellular target)은 다르지만 신경근육이음부(neuromuscular junction)에 작용한다는 공통된 특징을 갖고 있다. 이들 아형중 A와 B만이 현재 상품화 되어있다.

Botulinum toxin subtype A (BTX-A)는 heavy chain과 light chain으로 구성되어 있으며, heavy chain은 신경세포 표면에 있는 수용체와 반응하여 toxin이 세포 내로 endocytosis하는데 관여하고, light chain은 endopeptidase의 역할을 한다. 일단 BTX-A가 근육에 주입되면 endocytosis에 의해서 nerve terminal에 들어가 light chain이 exocytosis 과정에 관여하는 주요 단백질 중의 하나인 synaptosome-associated protein of 25 KDa (SNAP-25)[2]를 분해하여 신경전달물질인 acetylcholine(Ach)이 신경근육 이음부로 방출되는 것을 억제한다.[3, 4] Ach의 분비억제는 근육의 마비를 가져오는데, 이러한 작용은 주입 3-5시간 경과 후부터 시작되어 2주째에 효과가 최고에 이르게 된다.BTX-A에 의해 손상되었던 신경의 기능은 신경발아(neuronal sprouting), 신경근육이음부의 물질의 재정비에 의해 3개월 정도부터 돌아오기 시작하여 6개월째 거의 원래의 기능을 되찾게 된다.[5]

최근의 연구에 따르면, BTX-A의 선택적 기질인 SNAP-25가 신경세포 이외에도 소화관 평활근 세포[6]를 포함 한 여타 조직에서도 존재함이 보고되었다. SNAP-25는 exocytosis외에 세포막에 존재하는 ion

channel인 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel(CFTR),[7] 그리고 delayed rectifier K^+channels[8] 과 물리적으로 상호작용하여 이들 channel의 기능을 변화시킨다는 보고도 있다. Botulinum toxin에 관한 한 연구에서 toxin의 light chain을 평활근 세포에 주입하면 potassium channel current가 증가되어 세포내부의 과분극(hyperpolarization)을 유발하는데, [6] 이러한 현상은 식도의 Ca^{2+} activated channel currents와 delayed rectifier K^+ channel currents를 억제하고 있는 SNAP-25가 toxin의 light chain에 의해 분해되었기 때문이라고 하였다.[8]

따라서, BTX-A를 근육에 주입하였을 때 평활근 세포 내로 light chain이 들어갈 수 있다면 BTX-A가 SNAP-25를 분해하여 신경 작용에 관계없이 직접 근 이완을 유도할 수 있을 것이나, 평활근 세포막에 BTX-A heavy chain의 수용체가 있는지 여부는 확실하지 않다. 그럼에도 불구하고 기니픽의 전정부와 유문부의 근육절편을 BTX-A에 6시간 안정화하였을 때 저농도에서는 신경 억제 효과에 의해 근 이완이 나타나지만 고농도에서는 BTX-A가 직접 근수축 억제효과를 나타낸다는 결과를 발표하여 SNAP-25와

관련된 BTX-A의 또 다른 작용기전의 가능성을 언급한 바 있다.[9] 그러나 위의 실험은 고농도의 BTX-A에 근육절편을 배양(incubation)하였기 때문에 실제 근육주사를 통한 주입방법과 차이가 있으며, BTX-A의 농도 역시 치료농도와 다르고, 시간 경과에 따른 작용기전의 변화 가능성을 간과하였을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 BTX-A에 의한 근수축력 변화 및 그 기전을 알아보기 위한 조직욕조(tissue bath)를 이용한 *in vitro* 연구와 함께, BTX-A를 실험동물의 위전정부에 국소 주입 하여 근수축의 변화를 관찰하는 연구를 병행하여 그 효과를 비교 관찰 하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 위 전정부 윤상근 절편제작

무게 300-350g 기니픽을 사용하였다. pentobarbital sodium 35-40mg/kg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 개복하여 위를 길이방향으로 자른 다음 Krebs Hanseleite 용액으로 씻었다. (mM: 120 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$, 22 $NaHCO_3$, 1.2 NaH2PO_4, 11.5 glucose, oxygenated with 95% O_2-5% CO_2, pH 7.4) 점막을 전정부로부터 벗겨낸 후 전정부

윤상근에서 근육절편을 분리하여 조직욕조에 거치했다. 일반적으로 한 마리의 기니픽으로부터 두 개의 근육절편을 얻을 수 있었다. 근 장력은 isometric force transducer를 이용하여 윤상근의 길이방향으로 측정하였다. 근육절편을 길이방향으로 백금 전극 사이에 고정한 후, 전극을 electrical stimulator에 연결한다. 1시간의 안정기를 가진 후 실험을 시작하였다.

2. 보툴리눔 독소의 주입 방법 - 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구

기니픽에게 pentobarbital sodium 35-40mg/kg을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후, 27G 주사바늘로 위의 전정부 부위에 BTX-A를 근육주사 하였다. 전체 20U의 toxin을 1cc에 희석하여 전정부를 4분하여 각각에 주입하였다. (각각 0.25cc, 5U씩 주입) 대조군의 기니픽도 마찬가지로 시술하며 toxin대신 생리식염수를 주입하였다. 기니픽 위 전정부는 BTX-A주입 후 24 및 48시간 뒤 복부를 절개하여 위와 같은 방법으로 윤상근 절편을 제작하였다.

3. 장력 측정 방법

조직욕조에 거치한 근육절편에 일정농도(대조군, 2, 4, 10U)의 BTX-A를 첨가한 후 4Hz의 전장자극을 가하여 근수축력의 변화를 관찰하여 근수축 억제에 가장 효과적인 BTX-A의 농도를 찾았다. 그 다음 60mM 고농도 K^+ 를 투여하여 근수축을 유발 한 후 BTX-A 10U를 첨가하여 근수축 억제효과가 나타나는지를 관찰하고, NO synthase 억제제인 N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 μM)를 투여하여 NO에 의한 근이완을 억제하고 BTX-A 10U를 첨가 한 다음 EFS에 의한 근수축력 변화를 알아보았다. EFS는 1, 4 Hz, 100 V, 0.5-ms pulse width duration (square wave) 자극을 주면 신경을, 8, 20 Hz의 자극을 주면 근육을 선택적으로 활성화하는데, 이로써 BTX-A의 신경전달물질 분비 억제 및 직접 근수축 억제 여부를 알 수 있다. 이와 함께 위의 약물 첨가 후 Ach 100 μM 을 투여하여 근육절편의 근 장력 변화를 알아보았다.

생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 에서 연구에서 BTX-A 주입 24, 48시간 경과 후 얻은 근육절편 역시 조직욕조에 거치한 후 EFS 1, 4, 8,

20 Hz, 100 V, 0.5-ms pulse width duration (square wave)으로 근육절편을 자극하여 BTX-A에 의한 신경억제 및 직접 근수축 억제 여부를 알아보았다.

4. 조직학적 검사

기니픽 위 전정부에 BTX-A 주입 24 시간 및 48시간 경과하였을 때 나타나는 염증반응 등의 조직반응을 알아보기 위하여 BTX-A 주입 부위의 근육조직을 채취하여 10% 포르말린 용액에 약 6시간 이상 고정한 후 통상적인 조직 처리과정에 의해 조직을 에탄올(ethanol)에 통과시켜 탈색하고 파라핀 포매 조직을 만들어 5μm두께로 박절(thin section)한 뒤 절편을 Hematoxylin-Eosin 염색을 하였다. 보톡스 주입부위를 정상 조직 대조군과 비교하여 출혈, 염증세포의 침윤과 같은 조직학적 변화에 대해 광학 현미경하에서 관찰하였다.

5. 통계학적 분석

기니픽 유문부 근육절편의 근수축력은 kg/cm^2로 표현하였으며

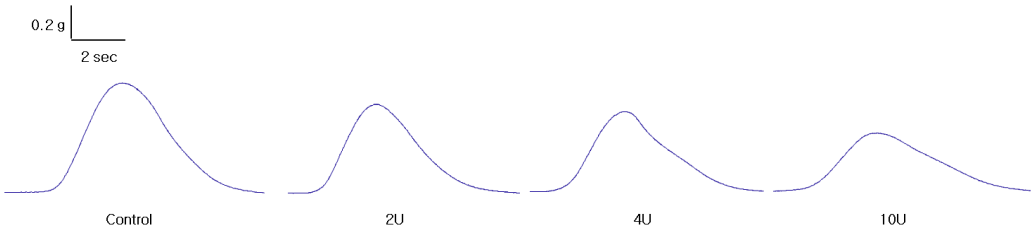
통계량은 평균±표준편차로 표시하였다. 대조군과 약물 첨가에 의한 수축력 변화의 비교는 비모수검정인 Mann-Whitney U test를 사용하였으며 세군 이상의 비교에서는 일원변량분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 유의성 검정은 P 값이 0.05미만인 경우로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. BTX-A에 의한 근수축력의 변화

근수축 억제 실험에 사용할 가장 효과적인 농도의 BTX-A를 찾기 위해 농도에 따른 근수축력 변화 실험을 시행하였다. BTX-A의 농도에 비례하여 근수축력이 의미 있게 감소하였다(그림 1A). 대조군의 수축력 (0.64±0.18 kg/cm^2)에 비하여 BTX-A 2U, 4U, 10U를 투여하였을 때의 근육절편의 수축력은 각각 0.52±0.14, 0.43±0.12, 0.34±0.15 kg/cm^{2}였다 (P<0.05, 그림 1B). 따라서 가장 효과적으로 근수축을 억제할 수 있는 BTX-A 10U를 조직욕조 *in vitro* 실험에 사용하였다.

A



B

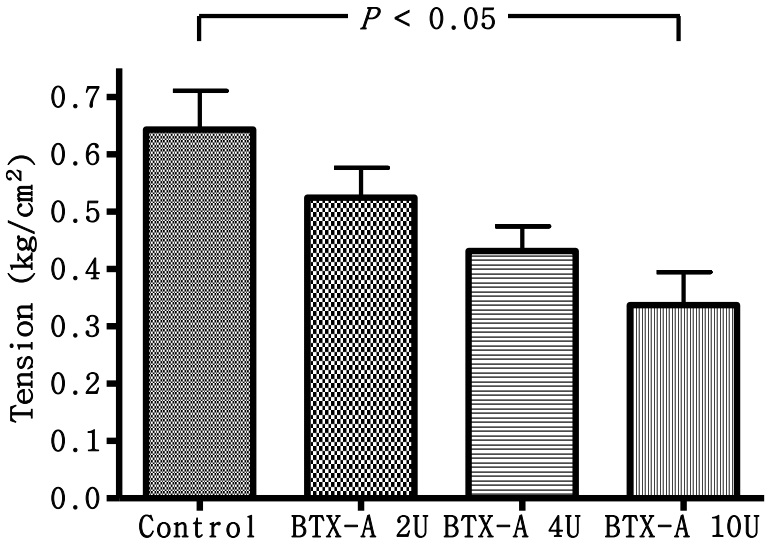


그림 1. BTX-A에 의한 근수축력의 변화

실제 근 수축 정도를 기록한 그림으로, BTX-A의 농도에 비례하여 근수축력이 감소하는 것을 알 수 있다 (그림A). BTX-A를 투여하였을 때의 근육절편의 수축력은 농도에 비례하여 대조군 보다 의미 있게 감소하였다 ($P<0.05$)(그림 B).

2. 고농도 K^+ 첨가 시 BTX-A에 의한 근수축력의 변화

고농도 K^+ 는 신경 및 근세포막을 탈분극시켜 근수축을 유도하는 물질로 BTX-A의 직접적인 근수축 억제 여부를 알기 위하여 BTX-A에 근육절편을 배양 후 고농도 K^+를 투여하였다. 고농도 K^+ 60 mM 투여 시 근수축력의 증가를 보였으며(2.65±0.75 kg/cm^2), 이러한 고농도 K^+으로 증가된 근 수축력은 BTX-A를 첨가 하였을 때 의미 있게 감소하여 BTX-A에 의한 근수축 억제효과를 확인할 수 있었다 (1.39±0.37 kg/cm^2) (n=4) ($P<0.05$)(그림 2).

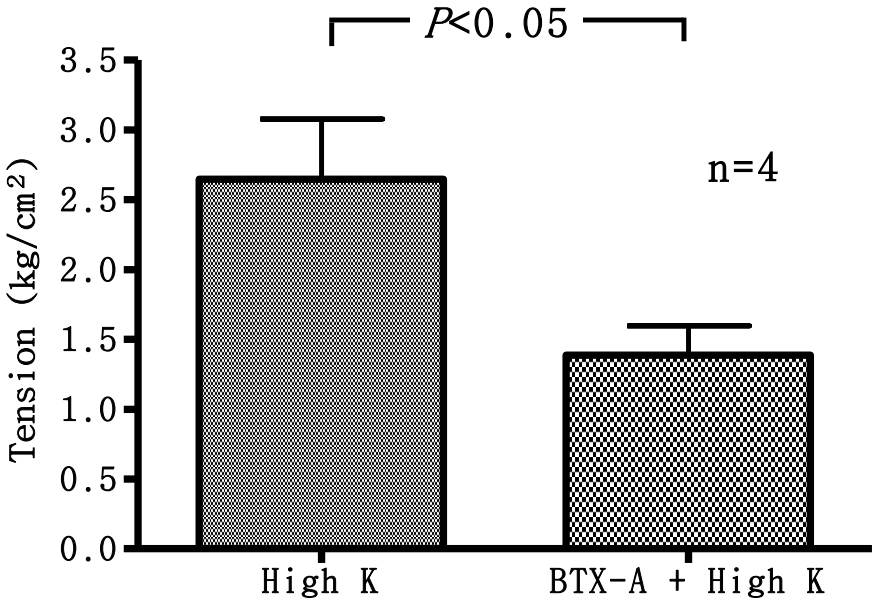


그림 2. 고농도 K^+ 첨가 시 BTX-A에 의한 근수축력의 변화

BTX-A 10U에 배양 후 고농도 K^+ 60 mM를 첨가 하였을 때 근수축력이 의미 있게 감소하였다 (n=4) ($P<0.05$)

3. 전장자극 (electrical field stimulation)시 L-NAME, 10U BTX-A에 의한 근수축력의 변화

전장자극은 낮은 주파수(1,4 Hz)에서는 신경을 자극하며 높은 주파수(8,20 Hz)에서는 직접적인 근 수축을 유발한다. 따라서, BTX-A에 의한 신경, 직접 근수축 억제 효과를 알아보기 위하여 근육절편을 BTX-A에

배양한 후 전장자극을 가하는 실험을 시행하였다. 처음 대조군에 nitric oxide(NO)에 의한 근이완 효과를 억제하기 위해 L-NAME 100μM 첨가 후 근육절편에 전장자극을 주었을 때 1,4,8,20 HZ에서 모두 대조군에 비해 근수축력이 증가하였으나 통계적으로 의미 있지는 않았다(P>0.05). 그 다음 L-NAME 100μM와 BTX-A 10U를 같이 투여하고 전장자극을 주었을 때에도 신경세포(1,4Hz) 및 근육세포를 직접활성화 시키는 정도의 자극(8,20Hz) 모두 에서 대조군 정도로 근수축력을 억제시켰으나 역시 통계적으로 의미 있지는 않았다(P>0.05)(그림 3).

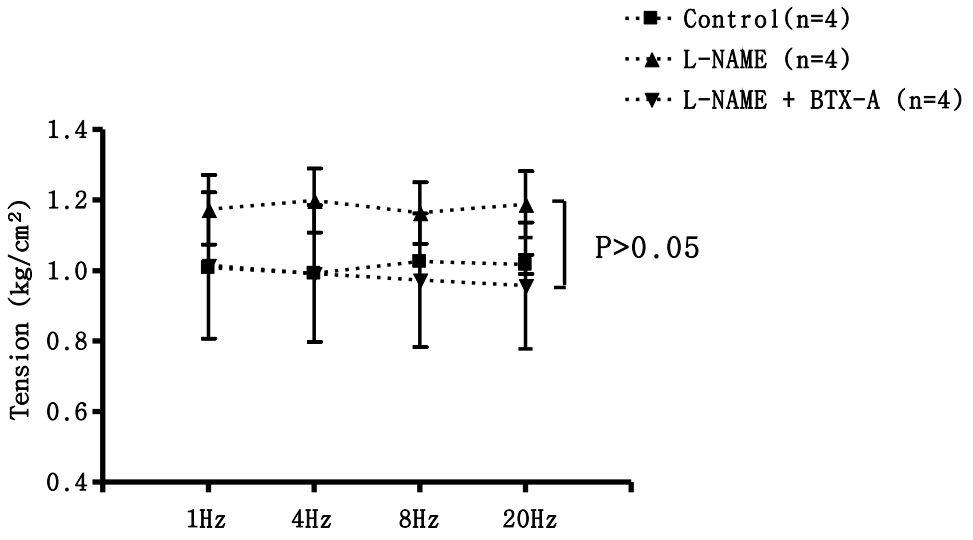


그림 3. 전장자극 시 L-NAME, 10U BTX-A에 의한 근수축력의 변화. L-NAME 100μM와 BTX-A 100U를 같이 투여하고 전장자극을 주었을 때 역시 모든

전장자극에서 대조군 정도로 근수축력이 감소하였으나 L-NAME 10μM 첨가 시의 근수축력과 비교할 때 감소 정도가 의미 있지는 않았다($P>0.05$).

4. Acetylcholine (Ach) 첨가 시 L-NAME, BTX-A에 의한 근수축력의 변화

역시 BTX-A에 의한 직접 근수축 억제효과를 확인하기 위하여 근육절편을 BTX-A에 배양한 다음 직접 근수축을 유발하는 Ach을 투여하는 실험을 시행하였다. 대조군에 Ach 100 μM 투여 시 근수축력의 증가를 보였으며, 이어 L-NAME를 투여 시 부가적인 근수축력의 증가를 보였으나(4.01±0.86 kg/cm^2) BTX-A를 투여 후 Ach과 L-NAME에 의한 근수축력은 의미 있게 감소하였다(2.31±0.22 kg/cm^2, n=4)($P<0.05$) (그림 4).

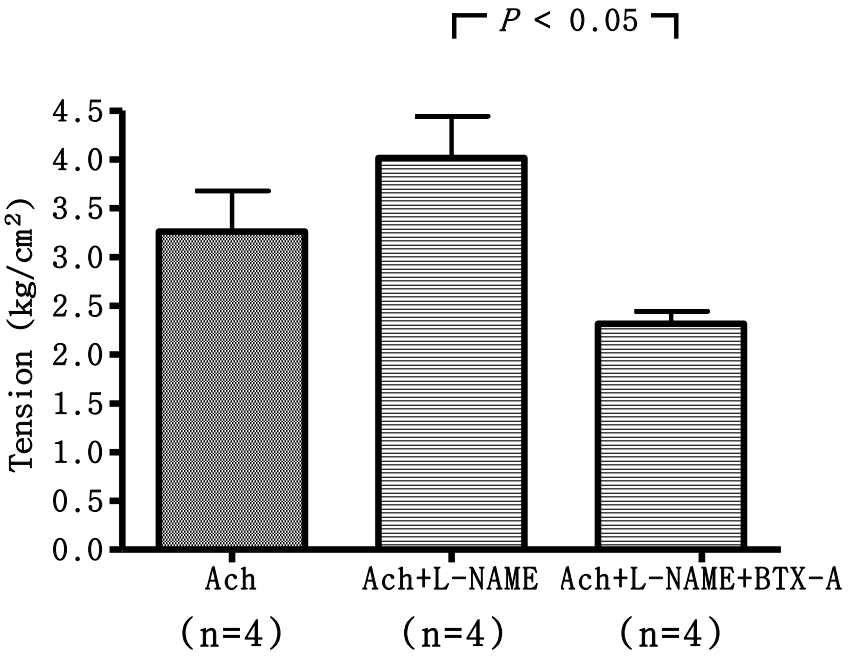
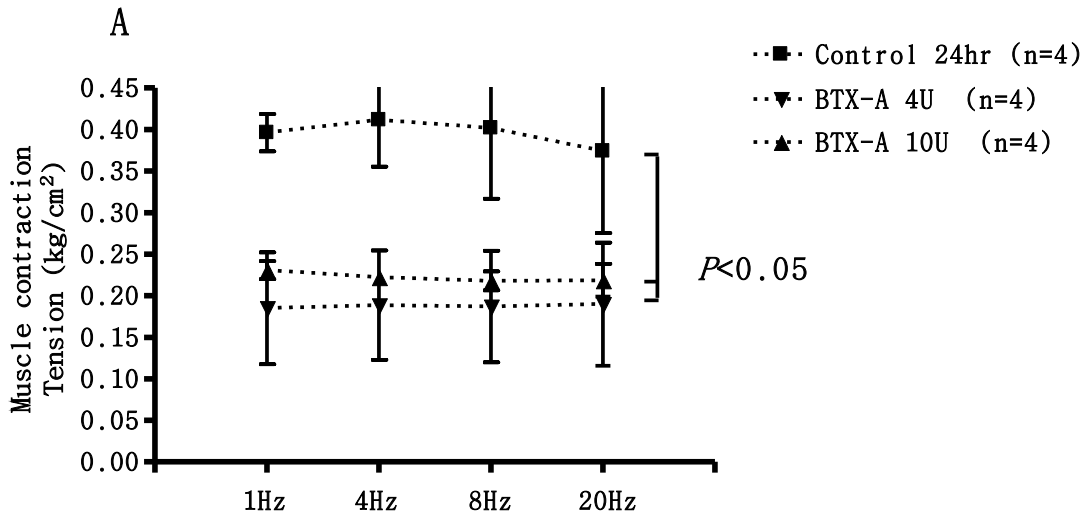


그림 4. Acetylcholine (Ach) 첨가 시 BTX-A에 의한 근수축력의 변화. BTX-A에 배양 후 Ach 및 L-NAME에 의해 증가된 근수축력은 의미 있게 감소하였다 (n=4) (P<0.05)

5. BTX-A 농도와 시간 경과 에 따른 근수축력의 변화 - 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구

BTX-A 4U와 10U를 기니픽 위 전정부에 각각 주입 후 24시간 및 48시간 경과 후 전장자극을 이용하여 근수축력을 검사하였다. 보톡스 주입 24시간 째 농도에 관계없이 모든 전장자극에서 의미 있는 수축력의 감소를

보였다 ($P<0.05$). 그러나 4U 및 10U 두군 사이의 근수축력 사이에 유의한 차이는 없었다($P>0.05$) (그림 5A). 48시간 경과 후 대조군 및 BTX-A 4, 10U군 모두에서 24시간에 비해 근수축력이 증가되었으나 양상은 24시간 때와 비슷하였다. 보톡스 주입 48시간 째 농도에 관계없이 모든 전장자극에서 의미 있는 수축력의 감소를 보였으나 ($P<0.05$), 4U 및 10U 두군 사이의 근수축력 사이에 유의한 차이는 없었다($P>0.05$) (그림 5B).



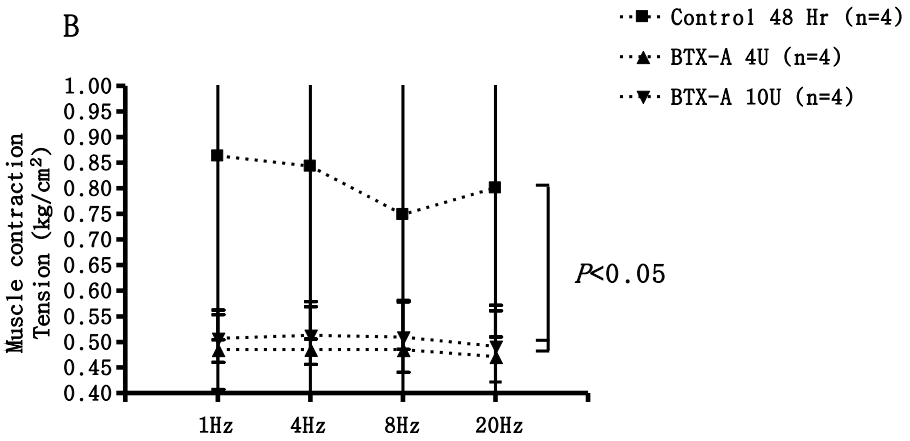


그림 5. BTX-A 농도와 시간 경과 에 따른 근수축력의 변화. BTX-A 주입 24 시간 째 농도에 관계없이 모든 전장자극에서 의미 있는 수축력의 감소를 보였다 ($P<0.05$) (그림 A). 48시간 경과 시에도 BTX-A 농도에 관계없이 모든 전장자극에서 의미 있는 수축력의 감소를 보였다($P<0.05$)(그림 B).

6. 기니픽 위 전정부에 BTX-A 10U 주입 24 시간 및 48시간 경과 하였을 때 나타나는 조직반응

BTX-A 4U를 주입 후 24 시간 및 48시간이 경과하였을 때는 근육조직에서 이상소견이 관찰되지 않았으나, BTX-A 10U를 주입하였을 때는 24시간 및 48시간 경과 하였을 때 모두 염증소견이 관찰되었다 (그림 6).

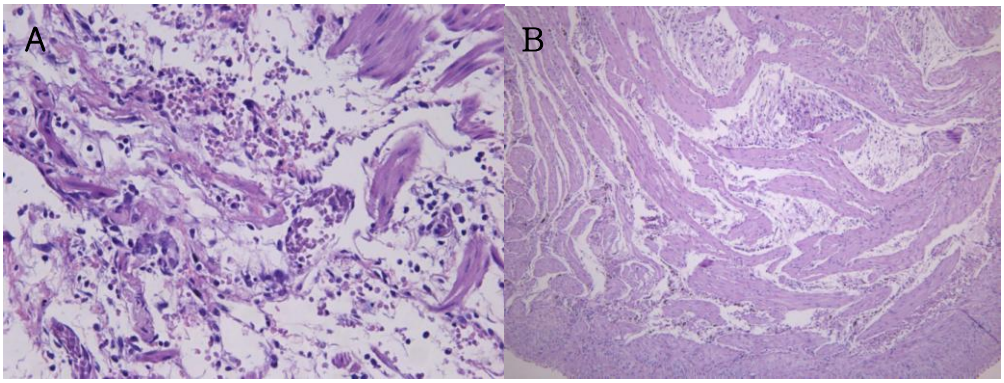


그림 6. 기니픽 위 전정부에 BTX-A 10U 주입 24 시간 및 48시간 경과하였을 때 나타나는 조직반응. BTX-A 10U 주입 24시간 (A) 및 48시간 (B) 모두에서 출혈 및 림프혈장 세포의 침윤이 관찰된다. (H&E stain, A: X 400, B: X 100)

Ⅳ. 고 찰

본 연구에서는 BTX-A 주입에 의한 근수축력의 감소가 기존에 알려져 있던 주요 기전인 신경억제 외에 근육세포에 직접 작용하여 효과를 나타내는 지 여부와 이러한 결과가 고농도로 BTX-A를 주입한 실제 동물 실험에서도 나타나는지, 나타난다면 시간에 따른 작용기전의 변화는

없는지를 알아보고자 하였다. BTX-A 10U를 조직욕조에 투여하였을 때 신경억제효과 외에 근수축의 직접억제 효과가 나타났으며, 생체 내 주입 및 희생 후 시행한 *in vitro* 연구에서도 BTX-A 주입 24 및 48시간 경과 후 고주파수의 전장자극에서 근수축이 억제되는 결과를 보여 위의 연구와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 단, BTX-A 주입 후 일주일 이상 경과하였을 때의 실험은 시행하지 않아 장기간 경과에 따른 기전의 변화는 관찰하지 못하였다.

연구의 첫 번째 단계로서 근수축 억제에 가장 효과적인 BTX-A의 농도를 알아보기 위해 기니픽 위 전정부에서 근육절편을 채취하여 1시간 안정시킨 후 4Hz의 전장자극 하에 BTX-A 농도에 따른 근수축력의 변화를 보았다. 안정화 시간을 2시간 둔 것은 BTX-A이 조직으로 확산해 들어가는 시간이 필요하여 BTX-A에 의한 반응이 천천히 점진적으로 일어나기 때문이다.[9] BTX-A에 의한 근수축 억제반응은 예상대로 BTX-A 농도에 비례하여 나타나서 BTX-A 10U 투여 시 대조군에 비해 53.5%로 수축력이 약해졌다. 이는 6시간의 안정기를 두었던 경우 수축력이 75% 억제된 것[9]과 비교하여 낮은 수치인데, BTX-A에 의한 근수축력 억제작용이 시간 및

농도에 비례한다는 이전 연구결과와 일치한다 할 수 있겠다.[10]

고농도 K^+ 용액은 신경을 자극할 뿐 아니라 근세포막을 탈분극시켜 근수축을 유도하는 물질이다.[11, 12] BTX-A에 일정시간 배양한 평활근 절편의 경우, 고농도 K^+에 의한 수축력의 크기가 대조군에 비해 유의하게 억제된 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 BTX-A가 신경 및 근수축을 동시에 억제하는 작용을 갖고 있다는 의미로 볼 수 있어 본 연구의 가설을 뒷받침하는 결과라 할 수 있겠다.

BTX-A의 전통적 작용기전은 신경근접합부로 Ach 유리를 방해하여 근수축을 억제하는 것으로 알려져 있으나, 최근 연구는 새로운 기전의 가능성을 보고하고 있다. 실제 환자에게 BTX-A 주입 하였을 때 BTX-A가 주변으로 확산 되는 것을 고려하여도 예상보다 넓은 부위에 경직이 호전되는 것이 관찰되었고[13, 14] 목 근육긴장이상(cervical dystonia) 환자를 대상으로 한 근전도 연구에서도 BTX-A 한번 주입에서 나타나지 않던 효과가 여러 번 반복해서 주입하는 경우 나타났는데,[15] 이는 BTX-A가 추내근 섬유(intrafusal fiber)에 분포해 있는 gamma motor neuron에 작용하여 근육수용기(muscle spindle activity)를 변화시키기 때문이라고

하였다.[16] 이외에도 근 이완 작용과 관계없이[17] 감각세포에 직접 작용하여 진통억제 효과를 나타낸다는 보고도 있다.[18] 본 연구에서도 BTX-A의 기존의 신경억제 기능 외에 새로운 기전을 확인할 수 있었는데, 고농도의 BTX-A를 근절편에 투여하였을 때 이전 보고와 마찬가지로[9] 직접적인 근수축 억제효과가 관찰되었으며, 이러한 효과는 주입 후 48시간 까지 지속되는 것을 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구에서 확인할 수 있었다.

BTX-A는 소화기 분야에서 여러 질환의 치료에 사용되고 있으나 실제 BTX-A의 소화관 평활근에 미치는 효과에 대한 연구는 많지 않다.[19, 20] 대부분은 임상질환과 관련된 연구로, BTX-A가 돼지 하부식도 괄약근의 압력을 감소시킨다는 것이 입증 된 후[21] 실제 아칼라지아 환자에게 적용하였으며,[22] 치열 환자의 고장성 항문괄약근(sphincter hypertonus)에 BTX-A를 주입하여 치열을 효과적으로 치료할 수 있었다고 보고[23]한 것이 대표적이다. 따라서 BTX-A의 평활근에 대한 작용은 주로 환자의 증상 및 식도내압검사 등 임상에서 평가할 수 있는 항목으로 평가되었고 이번 실험에서와 같이 BTX-A 주입 후 시간에 따른 수축력의 변화를 본 연구는

거의 없었다. 본 연구 결과에서 흥미로운 점은 첫째, 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구에서 고농도의 BTX-A 주입 후 24 및 48시간 경과 시 고주파 전장자극에 근수축이 직접적으로 억제되는 현상이다. 물론 BTX-A 주입 24 및 48시간 경과 시 나타나는 결과는 수술 후 장폐색(post operative ileus)과 독소 주입 시 발생할 수 있는 물리적 자극 및 염증반응에 의한 운동성 변화 가능성을 생각할 수 있겠다. 그러나 수술 후 장폐색은 고주파 전장자극에서 대조군보다 의미 있게 수축력이 감소한 결과를 보았을 때 BTX-A에 의한 직접적 근수축 억제를 생각할 수 있겠고, BTX-A 10U 주입 24시간 및 48시간 경과했을 때에는 출혈 및 염증소견이 관찰되나(그림 6) BTX-A 4U를 주입하였을 때는 이러한 반응이 관찰되지 않음에도 불구하고 BTX-A 10U와 같은 정도로 수축력이 감소되는 것을 보았을 때 역시 BTX-A의 직접적 근육억제 효과임을 생각할 수 있었다.

임상적으로 위 유문부 및 전정부에 BTX-A를 주입하는 치료는 위마비증과 심한 비만환자에게 사용되고 있다. 위마비증에서 BTX-A를 사용하는 것은 유문부 근육의 수축력이 감소하면 위 근위부로부터 내려온 음식물이 유문부로 내려올 때 저항이 낮아져 위배출능을 향상시킬 수 있지

않을까 라는 가설에서 출발한다. 실제 보톡스를 위마비 환자의 유문부에 주입하면 식전, 후의 유문의 압력 및 위상파 수축이 감소하며[24], 주입 1-3개월 동안 위배출능 및 증상이 호전되었다고 하였으나,[25] 이러한 결과는 아직 논란이 많다. 또한 심한 비만환자에게 보톡스를 유문부에 주입하면 근수축이 억제되고 음식물의 유문부로의 이동이 둔화되어 일찍 포만감을 느낄 수 있다.[26] 비만치료에 사용하는 BTX-A는 500 unit로 위마비에 일반적으로 사용하는 100-200 unit의 2-3배에 이른다. 보고에 의하면 큰 부작용은 없다 하였으나 직접 주입 후 24-48시간 경과 후 나타난 물리, 화학적 손상을 감안했을 때 사용할 수 있는 허용용량에 대한 연구가 반드시 필요하리라 생각된다.

본 연구의 제한 점으로는 첫째 현실적으로 BTX-A 구입비용이 적지 않아 많은 개체수를 대상으로 한 연구를 하기 어려웠다. 둘째, 같은 무게의 기니픽임에도 불구하고 대조군의 위전정부 수축력의 차이가 심하였다. 이는 다른 동물 실험에서도 마찬가지 한계인데 몸무게 외에 보다 객관적으로 동물의 상태를 파악할 수 있는 기준이 필요할 것으로 생각된다. 셋째로 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구에서 고주파수

전장자극 외에 직접적으로 근수축 억제 여부를 확인할 수 있는 실험, 즉 Ach에 대한 반응을 보는 등의 추가연구가 기전을 이해하는데 도움이 되었을 것으로 생각되었지만 시행하지 못하였다.

Ⅴ. 결 론

BTX-A는 근육경직을 특징으로 하는 여러 임상질환의 치료에 사용되고 있으며, 주요 작용 기전은 신경말단에 작용하여 근육신경이음부로 Ach이 분비되는 것을 억제하는 것이라고 알려져 있으나, 실제 임상에서 위의 기전만으로 증상호전을 설명하기는 쉽지 않다. 최근 연구에 따르면 고농도의 BTX-A는 신경억제가 아닌 직접적인 근수축 억제를 유발한다는 보고가 있었으나 *in vitro* study로서 입증에 한계가 있었다. 따라서 본 연구에서는 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구를 통해 위의 가설을 확인하고 시간에 따른 기전의 변화를 알아보고자 하였다. 그 결과 BTX-A를 조직에 주입하였을 때 신경억제 외에 근수축의 직접억제 효과가 나타났으며, 생체 내 주입 및 희생 후 *in vitro* 연구에서도 BTX-A

주입 24 및 48시간 경과 후 고주파수의 전장자극에서 근수축이 억제되는 결과를 나타냈다. 이상의 결과로 보았을 때 고농도의 BTX-A는 근수축의 직접억제 효과가 있으며 이러한 효과는 적어도 48시간 동안 지속됨을 알 수 있었다.

<참고문헌>

1. Eleopra R, Tugnoli V, Quatrale R, Rossetto O, Montecucco C. Different types of botulinum toxin in humans. Mov Disord 2004;19 Suppl 8:S53-9.

2. Pevsner J, Hsu SC, Braun JE, Calakos N, Ting AE, Bennett MK, et al. Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. Neuron 1994;13:353-61.

3. Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. Pharmacological Reviews 1981;33:155-88.

4. Rossetto O, Seveso M, Caccin P, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research. Toxicon 2001;39:27-41.

5. Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. Muscle Nerve Suppl 1997;6:S146-68.

6. Ji J, Lau H, Sheu L, Diamant NE, Gaisano HY. Distinct regional expression of SNARE proteins in the feline oesophagus. Neurogastroenterol Motil 2002;14:383-94.

7. Naren AP, Nelson DJ, Xie W, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, et al. Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. Nature 1997;390:302-5.

8. Ji J, Salapatek AM, Lau H, Wang G, Gaisano HY, Diamant NE. SNAP-25, a SNARE protein, inhibits two types of K channels in esophageal smooth muscle. Gastroenterology 2002;122:994-1006.

9. James AN, Ryan JP, Parkman HP. Inhibitory effects of botulinum toxin on pyloric and antral smooth muscle. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) 2003;285:G291-7.

10. Nakov R, Habermann E, Hertting G, Wurster S, Allgaier C. Effects of botulinum A toxin on presynaptic modulation of evoked transmitter release. Eur J Pharmacol 1989;164:45-53.

11. Shaari CM, Sanders I. Quantifying how location and dose of botulinum toxin injections affect muscle paralysis. Muscle Nerve 1993;16:964-9.

12. Borodic GE, Ferrante R, Pearce LB, Smith K. Histologic assessment of dose-related diffusion and muscle fiber response after therapeutic botulinum A toxin injections. Mov Disord 1994;9:31-9.

13. Erdal J, Ostergaard L, Fuglsang-Frederiksen A, Werdelin L, Dalager T, Sjo O, Regeur L. Long-term botulinum toxin treatment of cervical dystonia--EMG changes in injected and noninjected muscles. Clin Neurophysiol 1999;110:1650-4.

14. Giladi N. The mechanism of action of botulinum toxin type A in focal dystonia is most probably through its dual effect on efferent (motor) and afferent pathways at the injected site. J Neurol Sci 1997;152:132-5.

15. Brin MF, Fahn S, Moskowitz C, Friedman A, Shale HM, Greene PE, et al. Localized injections of botulinum toxin for the treatment of focal dystonia and hemifacial spasm. Mov Disord 1987;2:237-54.

16. Welch MJ, Purkiss JR, Foster KA. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. Toxicon 2000;38:245-58.

17. Urakawa N, Holland WC. Ca45 Uptake and Tissue Calcium in K-Induced Phasic and Tonic Contraction in Taenia Coli. Am J Physiol 1964;207:873-6.

18. Karaki H, Urakawa N, Kutsky P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi 1984;20:427-44.

19. Albanese A, Bentivoglio AR, Cassetta E, Viggiano A, Maria G, Gui D. Review article: the use of botulinum toxin in the alimentary tract. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 1995;9:599-604.

20. Albanese A, Bentivoglio AR, Cassetta E, Viggiano A, Maria G, Gui D. The use of botulinum toxinon smooth muscles. Eur J Neurol 1995;2:1-5.

21. Pasricha PJ, Ravich WJ, Hendrix TR, Sostre S, Jones B, Kalloo AN. Intrasphincteric botulinum toxin for the treatment of achalasia. N Engl J Med 1995;332:774-8.

22. Pasricha PJ, Ravich WJ, Kalloo AN. Botulinum toxin for

achalasia. Lancet 1993;341:244-5.

23. Gui D, Cassetta E, Anastasio G, Bentivoglio AR, Maria G, Albanese A. Botulinum toxin for chronic anal fissure. Lancet 1994;344:1127-8.

24. Mearin F, Camilleri M, Malagelada JR. Pyloric dysfunction in diabetics with recurrent nausea and vomiting. Gastroenterology 1986;90:1919-25.

25. Gupta P, Rao SS. Attenuation of isolated pyloric pressure waves in gastroparesis in response to botulinum toxin injection: a case report. Gastrointest Endosc 2002;56:770-2.

26. Ezzeddine D, Jit R, Katz N, Gopalswamy N, Bhutani MS. Pyloric injection of botulinum toxin for treatment of diabetic gastroparesis. Gastrointest Endosc 2002;55:920-3.

<영문요약>

A direct inhibitory effect of botulinum toxin type A on antral circular muscle contractility of guinea pig

Jung Ho Park

Department of Medicine

The Graduate school, Yonsei University

(Directed by Professor Hyojin Park)

BTX-A is now widely used for alleviating the symptoms of various spastic disorders. Classically, in striated muscle, BTX inhibits aceylcholine (Ach) release from cholinergic nerves. BTX-A selectively cleaves the synaptosomal-associated protein (SNAP)-25, leading to the inability of synaptic vesicles containing neurotransmitters. However, a recent study

suggested that, at higher concentrations, BTX-A directly inhibits smooth muscle contractility as evidenced by the decreased contractile response to Ach. Therefore, in this study, we intended to determine if this direct inhibitory effects of high dose BTX-A also exist when BTX-A was directly injected into the muscle layer of living guinea pig and if these effects are dependent upon time. At a high concentration of BTX-A, BTX-A decreases High K^+, EFS and Ach-induced contractile responses, And we could notice similar results in the study of direct injection to the muscle layer of guinea pig; 24hr and 48hr after BTX-A injection. In conclusion, High dose BTX-A directly inhibits smooth muscle contractility and these effects last at least 48 hours.

Key word: Botulinum toxin type A, Electrical field stimulation, gastric antrum, muscle contractility