

## 동종이식 연구를 위한 마우스 지방전구세포의 표지 및 분화 방법의 확립

김인옥<sup>1</sup> · 김택승<sup>1</sup> · 김미형<sup>1</sup> · 현원석<sup>2</sup> · 문구현<sup>2</sup> · 오갑성<sup>2</sup> · 방사익<sup>2</sup>

주식회사 안트로젠<sup>1</sup>, 성균관대학교 의과대학 삼성의료원 성형외과학교실<sup>2</sup>

### Differentiation and Labeling of Mouse Preadipocytes for Allogenic Transplantation Study

In Ok Kim<sup>1</sup>, Taek Seung Kim<sup>1</sup>, Mi Hyung Kim, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Won Sok Hyon, M.D.<sup>2</sup>, Goo Hyun Mun, M.D.<sup>2</sup>,  
Kap Sung Oh, M.D.<sup>2</sup>, Sa Ik Bang, M.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Anterogen, Co., Ltd, Seoul, Korea,

<sup>2</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery,  
Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University, College of  
Medicine, Seoul, Korea

Due to its safety and softness, autologous fat transplantation has been commonly performed for soft tissue correction. However, the injected fat is absorbed resulting in the reduction of volume of the graft by 40-60% within a few months. Thus, there was an attempt to use adipocytes differentiated from preadipocytes *in vitro* for transplantation. Differentiated adipocytes were biocompatible and matured with gradual volume increase at transplantation site in clinical study (unpublished data). In addition, they did not induce immune rejection in response to nonself lymphocytes in a mixed lymphocyte reaction (MLR) (unpublished data). The purpose of this study is to differentiate mouse preadipocytes following labeling into adipocytes to establish an animal model for allogenic transplantation. Preadipocytes isolated from inguinal and retroperitoneal fat pad of C57BL/6 mice were proliferated with growth medium by passage 3 and differentiated into adipocytes with different culture conditions after labeled with BrdU. At most suitable conditions, above 90% of preadipocytes were differentiated and BrdU labeling did not affect differentiation rate and function of differentiated adipocytes. These results demonstrate that BrdU-labeled adipocytes resulting from this *in vitro* differentiation protocol are useful for allogenic transplantation study.

**Key Words:** Preadipocyte, Adipocyte, Allograft

Received February 28, 2005

Revised April 19, 2005

**Address Correspondence:** Sa Ik Bang, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University College of Medicine, 50 Ilwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea, Tel: (02) 3410-2215 / Fax: (02) 3410-0036 / E-mail: si55.bang@samsung.com

### I. 서 론

주름 개선이나 함몰된 흉터 교정 등 연부조직 재생을 위해 실시되는 자가지방이식술은 인공보형물로 인한 이물감, 면역거부반응 등의 부작용을 나타내지 않으므로 오래 전부터 성형외과적 시술방법으로 널리 이용되어 왔다. 그러나 자가지방이식술의 경우 이식된 지방부피의 약 50% 정도가 3개월에서 6개월 사이에 서서히 흡수되므로 여러 번의 재수술을 필요로 한다는 문제점을 안고 있다.<sup>1,2</sup> 이는 자가지방을 얻는 과정 및 시술방법의 발달에도 불구하고 이식하는 지방세포의 상당수가 지방흡입 과정에서 파괴되거나 이미 노화되어 있어서 이식부위에서의 생착율이 저하되기 때문이다. 이러한 기존 방법의 문제점을 개선하기 위하여 저자들은 지방조직에 풍부하게 존재하는 지방전구세포를 지방세포로 분화시키는 방법을 연구한 바 있다. 지방전구세포로부터 분화된 지방세포의 경우, 파손된 세포가 거의 없고 어린 지방세포이기 때문에 기존의 지방이식술이 가지는 생착률의 문제점을 개선함은 물론 이식된 지방세포가 체내에서 성숙하므로 이식 후 점진적인 부피 증가 효과가 있을 것으로 기대된다.

한편, 분화된 지방세포의 자가이식은 환자 개개인에 대해 맞춤형 치료가 필요하므로 생산비용이 많이 들고 적용 범위가 한정되므로 동종이식에 대한 가능성 여부가 제기되었다. 성체 줄기 세포의 하나인 중간엽줄기세포는 세포 표면에서 제 2급 조직적합성 단백질의 발현이 제한되어 있으며 림프구 세포와 공동배양하여 혼합림프구반응을 실시하였을 때 림프구 세포의 증식을 억제한다고 알려져 있다.<sup>3</sup> 지방세포는 중간엽줄기세포로부터 유도될 수 있으므로 지방세포 또한 면역 내성과 관련이 있을 것으로 예상되며 실제로 시체에서 얻은 지방조직을 유방성형술에 이용하였을 때 면역거부반응의 증거를 찾아 볼 수 없었다는 임상 예도 발표된 바 있다.<sup>4</sup> 따라서 본 연구실에서는 서로 다른 조직적합성 단백질을 가진 환자로부터 얻은 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후 혼합림프구 반응을 실시한 바 있으며 그 결과 지방전구세포는 림프구 세포의 증식을 유도한 반면 분화된 지방세포는 human leukocyte an-

tigen(HLA) 부적합 여부와 상관없이 림프구세포의 증식을 촉진하지 않았다(N=3, 발표하지 않음). 이러한 실험 결과는 분화된 지방세포가 면역반응을 유발하지 않거나 면역세포에 대한 민감성이 상당히 저하되어 있을 가능성을 제시하는 것으로 이들 세포의 동종이식 가능성을 뒷받침하고 있다. 따라서 본 연구에서는 실험동물에서 분화된 지방세포의 동종이식 연구를 위하여 마우스 지방전구세포의 표지 및 지방세포로의 분화방법을 확립하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 지방전구세포의 분리 및 증식

지방전구세포를 얻기 위하여 H-2 haplotype이 b인 생후 8주 된 C57BL/6 내교배 마우스의 생식선 주변, 서혜부, 복막 후방 지방조직을 각각 분리하였다. 분리한 지방조직은 5% 요오드로 살균하고 Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (KRB;Sigma, K4002) 용액으로 2-3번 세척하여 요오드를 제거하였다. 지방조직은 멸균된 의료용 가위를 이용하여 작은 조각으로 자르고 같은 부피의 1% bovine serum albumin(Sigma, A2153)과 0.1% collagenase type I(Gibco, 17100)를 포함한 KRB용액을 첨가하여 37°C 항온수조에서 1시간 동안 두고 5분에 한번씩 흔들어 주면서 지방조직이 분해되도록 하였다. 5분 동안 1200 rpm의 속도로 원심분리하여 지방전구세포를 수집한 후 Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 Nutrient (DMEM/F12; JBL, LM 002-04)를 이용하여 두 번 세척하고 재부유시킨 후 100  $\mu$ m 나일론 그물망에 여과시켜 추출하였다. 분리된 지방전구세포는 10% fetal bovine serum(FBS; U.S. bio-technologies, FBU3214), 1 $\times$ penicillin-streptomycin(Gibco, 15240)을 포함한 DMEM/F12 배지를 넣고 24시간 동안 배양한 후 1-10  $\mu$ g/ml TGF- $\beta$ 1(R&D Systems, 100-B), FGF basic(R&D Systems, 233-FB), EGF(R&D Systems, 236-EG) 등의 성장인자와 10% FBS를 포함한 DMEM/F12 증식배지로 교환하여 배양하였다.

### 나. 지방세포 분화

3회 계대배양한 지방전구세포를  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>으로 세포배양플라스크에 접종하고 2일에 한번씩 증식배지로 교환하였다. 지방전구세포가 플라스크의 바닥을 가득 채울 때까지 자라면 10% FBS를 포함한 DMEM/F12 배양액으로 교환하고 2일 동안 추가 배양한 후 FBS, Insulin(Sigma, I2767), Dexamethasone(Sigma, D1756), Pantothenate(Sigma, P9153), Biotin(Sigma, B4501), Indomethacin(Sigma, I7378), Isobutylmethylxanthine(IBMx; Sigma, I5879) 등이 포함된 분화배지로 교환하였다. 분화배지에서

3일 동안 배양한 후 Indomethacin과 IBMx가 제거된 유지배지로 2-3일에 한번씩 교환하며 4-14일 동안 배양하였다.

### 다. 5-Bromo-2'-deoxy-uridine(BrdU) 표지 및 검출

BrdU 표지 및 검출은 제조회사 설명서에 따라 실시하였다. 지방전구세포를 3회 계대배양한 후 지방세포로 분화시키기 위한 마지막 증식 과정에서 지방전구세포가 플라스크에 약 50% 정도로 자랐을 때 BrdU 표지시약(Roche, 1 299 964)을 증식배지로 희석하여 10  $\mu$ M로 만든 후 세포에 첨가하였다. 24시간 배양 후 새로운 증식배지로 교환 한 후 지방세포로 분화시켰다. 표지된 BrdU는 면역염색반응으로 확인하였다.

### 라. Oil Red O 및 Hematoxylin 염색

Oil Red O염색은 기존의 시험법을 변형하여 실시하였다.<sup>5</sup> Oil Red O 보관 용액 (Oil Red O시약 0.5g을 100 ml isopropanol에 녹여 차광 보관)을 준비한 후 보관 용액 6ml와 증류수 4 ml를 섞어주고 1시간 동안 실온에서 방치한 후 거름종이를 이용하여 추출하였다. 분화 후 유지배지에서 5일 동안 배양한 지방세포를 Phosphate-Buffered Salines(PBS; Gibco, 70011)로 2번 세척하고 10% 포르말린이 포함된 PBS로 1시간 동안 고정된 후 증류수로 2번 세척하였다. 준비된 Oil Red O반응 용액을 넣고 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 증류수로 3회 세척하고 Hematoxylin(Sigma, HHS-16) 용액을 넣고 2분 동안 반응시켰다. 증류수로 3회 세척하고 현미경으로 관찰한 후 무작위적으로 6군데를 선택하여 400 배율로 사진을 촬영한 후 Oil Red O로 염색된 세포 수를 염색된 핵의 수로 나뉘 분화율을 계산하였다.

### 마. 렙틴 분비량 측정

렙틴 ELISA 분석은 제조회사 사용설명서에 따라 실시하였다(R&D Systems, MOB00). 분화 후 배양 4-14일의 세포배양액을 채취하여 분석을 실시하였다. 렙틴에 선택적으로 반응하는 항체가 코팅된 96-well plate의 각 well에 분석물 희석제 RD1-19를 50  $\mu$ l씩 넣고 렙틴 표준용액또는 채취한 세포배양액을 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 세척 후 효소가 결합되어 있는 렙틴 특이적인 항체를 넣어 실온에서 2시간 동안 반응시키고 세척하였다. 기질 용액을 넣고 대략 30분 정도 발색시킨 후 발색 반응을 멈추고 ELISA 판독기를 이용하여 발색 강도를 측정하였다.

### 바. 지방세포의 마우스 피하이식 및 생체검사

분화된 지방세포는 PBS로 1번 세척한 후 트립신을 넣고

5분 동안 반응시켜 단일세포로 분리시켰다. 10% FBS가 포함된 DMEM/F12 배지를 넣어 트립신을 비활성화시킨 후 1200 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세포를 수집하였다.  $1 \times 10^8$  개/ml의 농도가 되도록 DMEM으로 재부유시킨 후 18호 주사기 바늘을 이용하여 마우스 흉골 위 피하에 200  $\mu$ l씩 이식하였다. 1달 후 이식 부위를 biopsy하여 BrdU 염색반응을 실시한 후 현미경으로 관찰하였다.

### III. 결 과

#### 가. 지방조직 분리 위치에 따른 분화율 비교

Oil Red O 염색을 통하여 분화율을 측정된 결과, 마우스에서 지방조직이 가장 많이 분포하는 생식선 주변에서 분리한 지방전구세포의 분화율은 10% 미만인 반면 서혜부와 복막 후방 지방조직에서 분리한 지방전구세포는 80% 이상의 분화율을 보였다(Fig. 1). 따라서 이후의 실험에서는 마우스의 서혜부와 복막 후방 지방조직에서 분리한 지방전구세포를 이용하였다.

#### 나. 분화배지 구성에 따른 분화율 비교

분화배지 1, 2, 3에서 각각 10% 이하, 80%, 90-95%의 분화율을 나타냈으므로 분화배지 3의 조건하에서 지방전구세포가 가장 효과적으로 지방세포로 분화됨을 확인하였

다(Fig. 2). 또한 분화된 지방세포의 생물학적 활성을 확인하기 위하여 지방세포특이단백질인 렙틴 분비량을 측정된 결과 분화배지 1, 2, 3에서 분화된 지방세포는 각각 0(측정 범위 이하), 397, 912 pg/ml 농도의 렙틴을 분비하였다(Fig. 3).

#### 다. 시간에 따른 렙틴 분비량 측정

분화된 지방세포에서 분비된 렙틴은 유지배지에서 배양 4일째부터 측정되기 시작하였고 14일째까지 계속 증가하였으며 특히 10-14일 사이에 최고의 증가율을 나타냈다(Fig. 4).

#### 라. BrdU 표지

지방전구세포는 모두 BrdU로 표지되었으며(Fig. 5 Above, right), BrdU로 표지된 후에도 지방세포로의 분화에는 영향을 주지 않았다(Fig. 5 Below, left). BrdU로 표지한 후 분화시킨 지방세포를 마우스의 피하에 이식하고 생체 검사를 통해 BrdU 면역 염색반응을 실시한 결과, BrdU로 표지된 이식 세포를 확인할 수 있었다(Fig. 5 Below, right).

### IV. 고 찰

최근 성형수술이 일반화되면서 연부조직의 보정을 위하

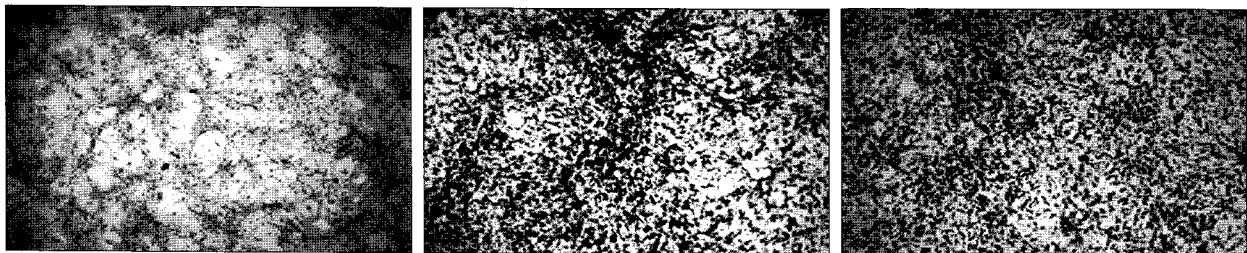


Fig. 1. Differentiation of preadipocyte isolated from various fat tissue. Preadipocytes were isolated from gonadal (Left), inguinal (Center) and retroperitoneal (Right) fat tissue of C57BL/6 mice, and then differentiated into adipocytes. On day 5 post-induction of differentiation, the differentiated adipocytes were stained with Oil Red O as described in Materials and Methods. This shows a representative data of five independent experiments.

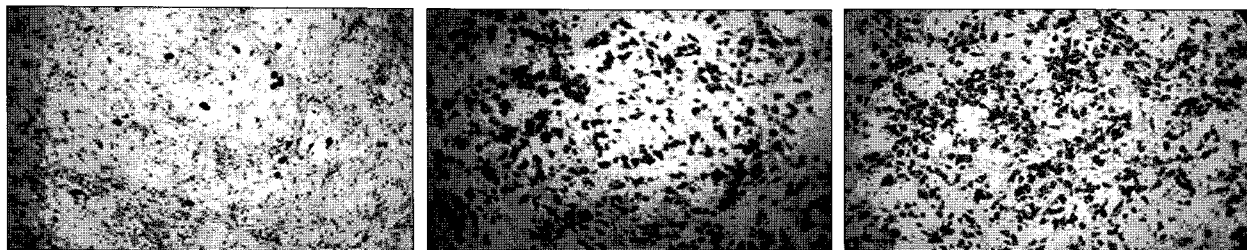
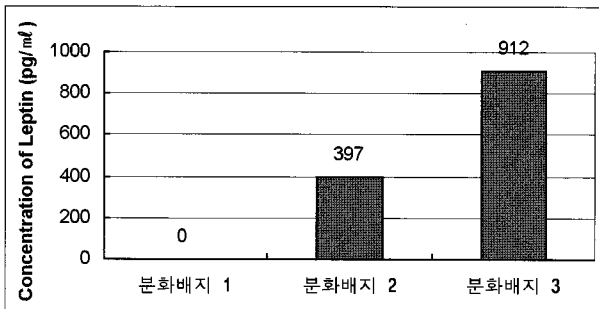


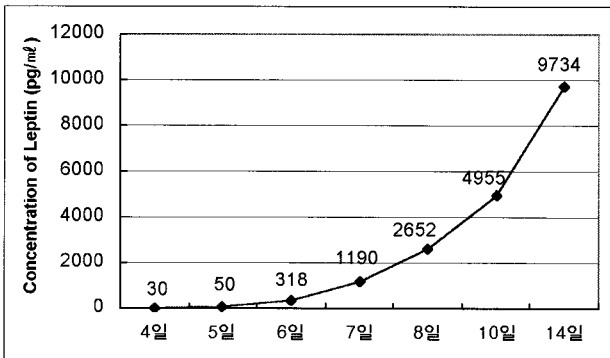
Fig. 2. Differentiation of preadipocyte under different culture conditions. Preadipocytes isolated from inguinal and retroperitoneal fat tissue were cultured with three kinds of differentiation media supplemented with different component and amount for 3 days (Left; Medium 1, Center; Medium 2, Right; Medium 3). The detailed composition of the media was described in Table I. On day 5 post-induction of adipogenic differentiation, the differentiated adipocytes were stained with Oil Red O.

**Table 1.** Compositions of Differentiation Media

성분	분화배지 1	분화배지 2	분화배지 3
DMEM/F12			
FBS	10 %	3 %	10 %
Dexamethasone	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Pantothenate		1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Biotin		33 $\mu$ M	33 $\mu$ M
Insulin	500 nM	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M
Indomethacin		100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
IBMX	0.25 mM	0.25 mM	0.25 mM



**Fig. 3.** Differentiation of preadipocyte under different culture conditions. On day 10 post-induction of adipogenic differentiation, supernatant of culture medium was harvested and the amount of secreted leptin was measured.



**Fig. 4.** Secretion of leptin. After post-induction of differentiation, supernatant of culture medium was collected at the indicated time points and subjected to leptin assay as described in Materials and Methods.

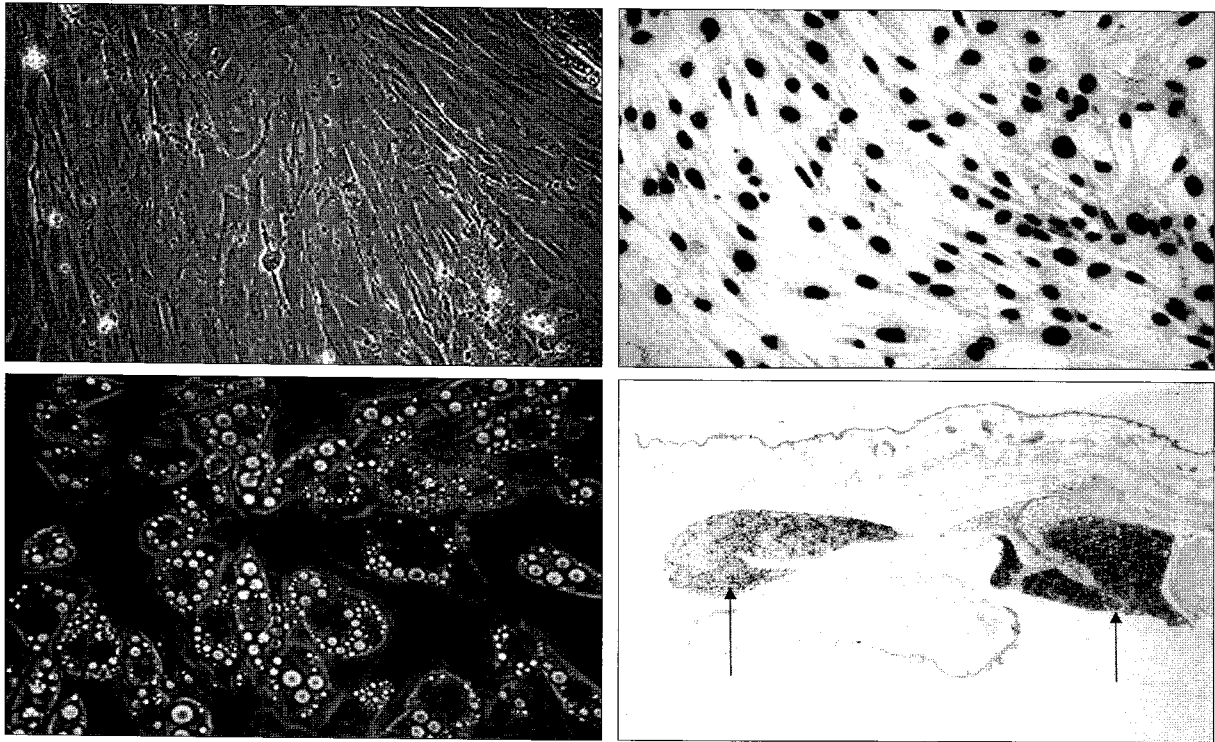
여 콜라겐, 피브린, 히알루론산, 실리콘 등과 같은 충전제가 많이 사용되고 있다.<sup>6</sup> 그러나 이러한 충전제들은 체내에서 면역거부반응을 일으킬 수 있고, 파괴되면서 주변조직이 괴사하는 등의 부작용이 발생할 수 있으며 효과 지속기간이 짧아 4-6달에 한번씩 재수술을 해야 한다는 단점을 가지고 있다. 연부조직을 채워주는 다른 방법으로 자가

지방이식술이 시행되는데, 지방흡입수술로 얻어지는 지방조직을 원심침전법을 이용하여 혈액 등을 제거한 후 이식하는 것으로 자가 유래이므로 면역거부 반응과 이물감이 없어 널리 이용되고 있다. 그러나 이와 같이 단순 분리하여 얻은 지방조직은 지방조직흡입수술 시 가해지는 압력 등으로 약 90% 정도의 지방세포가 파괴되고, 남아 있는 세포도 대부분 노화된 세포로 이식 후 3-6개월 사이에 40-60%가 흡수되므로 재수술이 필요하다.<sup>12</sup>

이러한 문제점을 개선하기 위하여 지방조직에 풍부하게 존재하는 지방전구세포를 분리하여 증식시킨 후 지방세포로 분화시켜 자가지방이식에 사용하고자 하는 연구가 본 연구진에 의해 진행되고 있다. *In vitro*에서 분화된 지방세포는 건강한 어린 지방세포로서 이식 후 체내에서 성숙하므로 점진적인 부피 증가는 물론 흡수율을 최소화하여 효과 지속 기간을 늘릴 수 있을 것이다. 그러나 자가의 분화된 지방세포의 경우 다른 자가이식 세포 치료제와 같이 생산비용이 많이 들고 적용 범위가 한정되므로 동종이식에 대한 가능성 여부가 제기되었다.

본 연구에서는 동종이식 연구를 위한 실험동물 모델로서 면역체계에 대한 동정이 확립되어 있고 이미 기존의 연구들에 광범위하게 이용되고 있는 마우스를 선정하였다. H-2 haplotype이 b인 C57BL/6 마우스의 지방조직을 추출한 후 지방전구세포를 분리하였다. 분리한 지방전구세포는 분화를 유도하기 전에 이식하기에 충분한 세포수로 증식 시켜야 하는데, 10% FBS만 포함하는 DMEM/F12 배양배지에서는 1세대에서만 증식이 가능하고 1계를 초과할 경우 증식하지 않았다. 따라서 지방전구세포를 충분한 수로 증식시키기 위해 FGF basic, TGF- $\beta$ 1, EGF 등의 성장인자를 첨가하여 3세대까지 배양하여 지방세포 분화 실험에 사용하였다(결과 보이지 않음).

마우스의 분화된 지방세포를 실험동물 체내에 이식하고 이식된 세포의 추적실험을 위해서는 세포를 이식하기 전에 적절한 방법으로 표지해야 한다. 일반적으로 지방전구세포를 표지하는 방법으로 BrdU가 사용되고 있으나 일단



**Fig. 5.** BrdU labeling and Detection. (Above, left) Preadipocytes, (Above, right) preadipocytes labeled with BrdU, (Below, left) differentiated adipocytes after BrdU labeling, (Below, right) differentiated adipocytes transplanted into mouse subcutaneous tissue ( $\times 20$ ).

BrdU로 표지된 지방전구세포는 지방세포로의 분화가 용이하지 않다고 알려져 있다. 즉 확립된 세포주인 3T3-L1 지방전구세포의 경우 insulin, dexamethasone, IBMX 등으로 분화시킬 경우 대부분이 지방세포로 분화되나<sup>7</sup> BrdU를 처리한 후에는 지방세포로 분화되지 않았다.<sup>8</sup> 한편, 3T3-F442A 지방전구세포나 설치류 지방전구세포를 일차배양할 경우 지방세포로의 분화율을 높이기 위해서 transferrin, indomethacin 등을 분화유도 배지에 첨가하거나 matrigel과 같은 세포의 기질을 플라스크에 코팅한 후 배양하는 방법 등이 이용되기도 한다.<sup>9,10</sup> 따라서 본 논문에서는 C57BL/6 마우스에서 분리한 지방전구세포를 BrdU로 표지한 후에 지방세포로 분화시키기 위하여 본 연구진에 의해 이미 확립되어 있는 인간의 지방전구세포를 분화시키는 조건을 변형시켜 실험하였다. 그 결과 indomethacin, pantothenate, biotin 등이 더 첨가된 분화배지 3에서 분화율이 가장 높게 나타났다(Fig. 2, 3). 설치류 유래 세포주의 경우 Indomethacin이 렙틴 분비를 억제한다고 알려져 있으나<sup>11</sup> 본 실험의 결과 Indomethacin이 포함되지 않은 분화배지 1에서는 분화율이 미미한 반면 분화배지 3에서 효과적으로 지방세포의 분화가 일어나고 렙틴의 분비량도 증가한 것으로 보아 Indomethacin이 C57BL/6 마우스 지방전구세포에서는 오히려 렙틴을 분비하는 지방세포로의 분화를 촉

진하는 것으로 보인다(Fig. 2, 3).

분화배지 3의 조건에서 서혜부와 복막 후방 유래 지방전구세포는 분화 4일 이후부터 렙틴이 분비되기 시작하여 14일까지 계속 증가하였다(Fig. 4). 렙틴은 음식물 섭취와 에너지 대사를 조절하는 펩티드 호르몬으로서 백색 지방에서 특징적으로 분비되는 물질이므로 본 실험 조건에서 분화시킨 지방세포는 체내에서 자연적으로 분화된 지방세포와 유사한 세포생물학적, 생화학적 성격을 가지는 세포임을 의미한다.<sup>12</sup> 또한 Oil Red O 염색을 통한 분화율과 렙틴 분비량은 상호 밀접한 연관성을 가지므로 이 두 가지 분석방법이 분화된 지방세포를 확인하기에 적합하다고 할 수 있겠다.

세 부위의 지방조직 분리 위치 중 가장 많은 지방조직을 얻을 수 있는 생식선 주변 유래의 지방전구세포의 분화율은 10% 미만으로 동종이식 실험에 부적합한 반면 서혜부와 복막 후방에 위치한 지방조직에서 분리한 지방전구세포는 분화배지 3의 조건에서 90% 이상이 지방세포로 분화(Fig. 1)하는 것으로 보아 지방조직의 기원에 따라 지방전구세포의 세포생물학적 특성이 다름을 제시한다.

발표된 논문에 의하면 3T3-L1 세포주의 경우  $5 \times 10^{-8}$  M 이상의 농도로 BrdU를 처리할 경우 지방세포로 분화되지 않는다고 알려져 있으나<sup>8</sup> 본 실험의 분화 조건 하에서는 10

$\mu$ M의 BrdU를 처리한 후에도 90% 이상의 분화율을 보였으며(Fig. 5 Below, left), 마우스 피하에 이식 후 조직을 떼어내어 BrdU 면역염색 반응을 실시하였을 때 선명하게 관찰할 수 있었다(Fig. 5 Below, right). 즉 일반적으로 사용되는 BrdU 농도보다 고농도로 세포를 표지하여 실험동물의 체내 이식에 이용함으로써 이식 한달 후에 실시한 조직 생검에서 이식세포의 모니터링이 용이하였다.

본 실험 결과를 통하여 확립된 방법으로 생산된 분화된 지방세포는, 인간의 분화된 지방세포의 동종이식 가능성을 판단하기 위한 실험동물모델로, 동종 마우스의 피하에 이식 후 추적하기에 적합하다고 사료된다.

## V. 결 론

본 실험에서는 마우스의 지방전구세포로부터 지방세포로의 분화조건 및 세포표지 방법을 확립하였다. H-2 haplotype이 b인 C57BL/6 마우스의 서혜부 및 복막 후방 지방 조직에서 분리한 지방전구세포를 3세대까지 증식시킨 후 BrdU로 표지하고 10% FBS와 Insulin, Dexamethasone, IBMX, Indomethacin 등이 포함된 분화배지로 3일간 분화를 유도한 후 유지배지에서 배양할 경우 5-10일 사이에 90% 이상이 지방세포로 분화하였고 분화 4일 이후부터 지방세포 특이단백질인 렙틴을 분비하였다. 또한 분화된 지방세포를 마우스 피하에 이식한 후에도 생체검사 및 면역염색법을 통하여 이식세포를 효과적으로 관찰할 수 있었다. 따라서 본 실험조건으로 생산하여 수집한 마우스의 분화된 지방세포는 인체에 존재하는 지방세포와 유사한 세포생물학적 특징을 지니며 이식세포의 추적이 용이하므로 동종이식 가능성을 판단하기 위한 동물실험 모델로 적절하다고 사료된다.

## REFERENCES

1. Monreal J: Fat tissue as a permanent implant: New instruments and refinements. *Aesthetic Surg J* 23: 213, 2003
2. Eremia S, Newman N: Long-term follow-up after autologous fat grafting: Analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments. *Dermatol Surg* 26: 1150, 2000
3. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol* 30: 42, 2002
4. Rosen PB, Hugo NE: Augmentation mammoplasty by cadaver fat allografts. *Plast Reconstr Surg* 82: 525, 1988
5. Fink T, Abildtrup L, Fogd K, Abdallah BM, Kassem M, Ebbesen P, Zachar V: Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells* 22: 1346, 2004
6. Sclafani AP, Romo T: Injectable fillers for facial soft tissue enhancement. *Facial Plast Surg* 16: 29, 2000
7. Student AK, Hsu RY, Lane MD: Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 225: 4745, 1980
8. Green H, Meuth M: An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127, 1974
9. Viravaidya K, Shuler ML: The effect of various substrates on cell attachment and differentiation of 3T3-F442A preadipocytes. *Biotechnol Bioeng* 78: 454, 2002
10. Litthauer D, Serrero G: The primary culture of mouse adipocyte precursor cells in defined medium. *Comp Biochem Physiol* 101A: 59, 1992
11. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J: Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J Clin Invest* 98: 1004, 1996
12. Sen A, Lea-Currie R, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YC, Gimble JM: Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* 81: 312, 2001