대한성형외과학회지. 제 33 권, 제 4 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 33, No. 4, 423 - 426, 2006

자가지방주입에서 지방세포의 생존을 위한 적절한 원심분리 조건

장경민 · 김종엽 · 양정덕 · 정호윤 · 박재우 · 조병채

경북대학교 의과대학 성형외과학교실

Proper Condition of Centrifugation for the Fat Cell Viability in the Autologous Fat Injection

Kyung Min Jang, M.D., Jong Yeop Kim, M.D.,
Jung Duk Yang, M.D., Ho Yun Chung, M.D.,
Jae Woo Park, M.D., Byung Chae Cho, M.D.

Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: In the autologous fat injection, the centrifugation is useful for the refinement of harvested fat. As it can be an injury to the fat cell, we studied the fat cell viability with the change of centrifugation velocity and centrifugation time in order to get the limits of centrifugation velocity and centrifugation time.

Methods: We used the Colman System in 8 patients. We handled the control group with no centrifugation, group I with the centrifugation with 1500 rpm for 1 minute, group II with 1500 rpm for 3 minutes, group III with 1500 rpm for 5 minutes, group IV with 3000 rpm for 1 minute, group V with 3000 rpm for 3 minutes, group VI with 3000 rpm for 5 minutes, group VII with 5000 rpm for 1 minute, group VIII with 5000 rpm for 3 minutes, group IX with 5000 rpm for 5 minutes. We used the collagenase to separate the fat tissue. We had evaluated the fat cell viability by checking survival cell counts.

Results: There was no significance in group I, II, IV, V, but there was significant difference in group III, VI, VII, VIII, IX.

Conclusion: The centrifugation with 3000 rpm for 3 minutes is recommendable.

Key Words: Fat cell viability, Centrifugation

I. 서 론

노화나 반흔에 의한 함몰부위의 교정은 오래 전부터 성형외과 영역의 관심이었으며 함몰부위의 교정을 위한 많은 방법들이 연구되었다.[1] 많은 방법들 중에서 현대에 널리 쓰이는 교정방법으로는 자가지방(autologous fat)의 주입이 있다.[2] Coleman이 주사기 형태의 캐뉼라(needle type canula)를 이용한 자가지방의 채취 및 주입방법을 개발한 이후 자가지방주입(autogenic fat injection)에 대해 많은 연구가 이루어졌다.[3]

현재 자가지방주입은 채취 부위 및 주입 부위에 반흔이 거의 생기지 않을 뿐 아니라, 대량 채취가 가능하며, 다른 인공충전물질에 비해 인체에 안정적이며, 그 효과가 거의 영구적이며 주변부와 매우 자연스러운 조화를 이룬다는 장점으로 매우 널리 쓰이고 있다.

그러나 자가지방주입은 수기 자체가 다른 인공물질의 주입에 비해 비교적 복잡하며, 무엇보다 주입 후, 지방세포의 생존을 예상할 수 없다는 단점이 있다.[2,3]

물론 자가지방의 주입 후, 개체간에도 주입한 지방세포의 생존률은 크게 차이가 있지만, 자가지방을 채취, 정제하는 과정에서도 지방세포는 손상을 입을 수 있으며 그 손상에 의해 지방세포의 생존률이 크게 차이를 보일 수 있다.

본 연구는 그 중에서 채취한 지방조직을 정제하기 위해서 사용되는 각기 다른 조건(원심분리 속도, 원심분리 시간)의 원심분리(centrifugation) 과정에서 생존 지방세포수를 알아봄으로써 적절한 원심분리 조건을 알아보기로 하였다.

Received February 6, 2006
Revised May 29, 2006

Address Correspondence : Byung Chae Cho, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kyungpook National University Hospital, 50 Samduk 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea. Tel: 053) 420-5685 / Fax: 053) 425-3879 / E-mail: bccho@knu.ac.kr

II. 재료 및 방법

가. 수술방법 및 실험군

지방흡입을 목적으로 수술을 하는 각기 다른 8명의 환자를 대상으로 하였다.

국소마취 용액으로 1L 하트만 용액(Hartman solution)에 20 ml 리도카인(2% lidocaine solution) 용액과, 0.5 ml 에피네프린 용액(0.1% epinephrine solution)을 혼합하여 채취 전에 하복부에 균일하게 주입하였다. 18 gauze 캐뉼라(Coleman system)와 10 ml 주사기(Coleman system)를 이용하여 2 cc의 음압이 일정하게 유지되도록 하여 하복부

에서 지방을 8 ml씩 10회에 걸쳐 채취하였다. 채취된 지방조직은 원심분리기(Coleman system)를 이용하여 1500 rpm, 3000 rpm, 5000 rpm의 조건에서 각각 1분, 3분, 5분간 원심분리를 행하였다.

원심분리를 행하지 않은 군을 대조군으로 설정하고, 각기 다른 원심분리 속도(rpm)와 원심분리 시간에 따라 1500 rpm에서 1분간 원심분리를 행한 군을 I군, 1500 rpm에서 3분간 원심분리를 행한 군을 II군, 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 행한 군을 III군, 3000 rpm에서 1분간 원심분리를 행한 군을 IV군, 3000 rpm에서 3분간 원심분리를 행한 군을 V군, 3000 rpm에서 5분간 원심분리를 행한 군을 VI군, 5000 rpm에서 1분간 원심분리를 행한 군을 VII군, 5000 rpm에서 3분간 원심분리를 행한 군을 VIII군, 5000 rpm에서 5분간 원심분리를 행한 군을 IX군으로 하여 1개의 대조군과 9개 실험군을 설정하였다.

9개의 실험군들은 각기 정해진 조건에서 원심분리를 행한 후, 기름(oil)층, 지방세포층, 혈장 및 국소마취용액층으로 나누어진 상태에서 가볍게 주사기를 회전(rolling)시켜 다시 균일하게 섞었다. 같은 집적도를 가진 지방세포층을 얻기 위해 모든 실험군은 1000 rpm에서 1분간 원심분리를 다시 행하였다. 대조군은 지방 채취 후, 주사기를 가볍게 세워둠으로써 3층으로 분리 한 후, 역시 가볍게 주사기를 회전시켜 다시 균일하게 섞은 후, 1000 rpm에서 1분간 원심분리를 행하였다.

나. 생존세포 수 측정

각 주사기의 정제된 지방세포층에서 지방조직만 1 ml를 취하여 생리식염수 2 ml와 혼합한 후 제 I형 콜라게나제 용액(0.45% Serva Collagenase, Promega, Co. U.S.A) 1 ml을 첨가하여 균일하게 혼합한 후, 38.6℃에서 2시간 조직분해하였다. 조직분해된 지방세포를 원심분리하여(200 × g, 1분) 가장 윗층의 기름을 제외한 기름층 바로 아래의 지방세포 부유층에서 마이크로 피펫을 이용하여 10 μl를 취하였다.

Tryphan blue로 염색하여, 100배 시야에서 10 μl에서의 살아있는 지방세포의 수를 세어 각 그룹간의 지방세포 생존을 비교하였다. 지방세포가 터져서 Tryphan blue시약이 세포내부로 들어온 경우, 세포 내에 공포가 형성되어 있는 경우, 세포막을 유지하지 못하고 있는 경우에는 살아있는 지방세포에 포함시키지 않았다.

다. 통계분석

통계분석은 SPSS 10.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.)을 사용하여 각 실험군에서 관찰된 살아있는 지방세포의 수의 비교를 Mann-Whitney 방법을 이용하여 검정하였다.

III. 결 과

Coleman 원심분리기를 이용하여 1500 rpm에서 1분, 3분, 5분간 원심분리를 행한 경우 각각 1 ml당 135.4 ± 4개, 135.1 ± 6개, 130.4 ± 4개의 살아있는 지방세포가 관찰되었으며, 3000 rpm에서 1분, 3분, 5분간 원심분리를 행한 경우, 136.1 ± 2개, 134 ± 4개, 128 ± 2개의 살아있는 지방세포가 관찰되었으며, 5000 rpm에서 1분, 3분, 5분간 원심분리를 행한 경우, 128.9 ± 6개, 125.5 ± 2개, 117.8 ± 6개의 살아있는 지방세포가 관찰되었다.

1500 rpm에서 5분 이상 원심분리를 행한 경우와 3000 rpm에서 5분 이상 원심분리를 행한 경우, 그리고 5000 rpm에서 1분 이상 원심분리를 행한 경우에는 다른 집단과 비교해 보았을 때, 관찰된 살아있는 지방세포의 수가 통계학적으로 의미가 있을 정도로 낮게 관찰되었다($p < 0.05$) (Table I).

현미경 시야에서의 세포 상태도 1500 rpm에서 3분 이하, 3000 rpm에서 3분 이하의 원심분리를 행한 군의 세포 상태는 대조군과 비교하여 별다른 차이가 없었으나(Fig. 1), 1500 rpm에서 5분, 3000 rpm에서 5분간 원심분리를 행한 경우에는 현저한 세포의 파괴가 관찰되었다(Fig. 2, 3).

IV. 고 찰

자가지방주입은 다른 인공적인 충전물질에 비해 인체에 좀 더 안정적이며 주입 후 주변조직과 좀 더 자연스러운 조화를 이룰 수 있다는 장점 및 일단 안정화된 후에는 그

Table I. Mean Numbers of the Viable Fat Cells after Centrifugation, Checked in Microscopic View(× 100)

	1 minute	3 minutes	5 minutes
1500 rpm	135.4 ± 4	135.1 ± 6	130.4 ± 4†
3000 rpm	136.1 ± 2	134.0 ± 4	128.0 ± 2†
5000 rpm	128.9 ± 6†	125.5 ± 2†	117.8 ± 6†

†: Statistically significant by Mann-Whitney method($p < 0.05$)

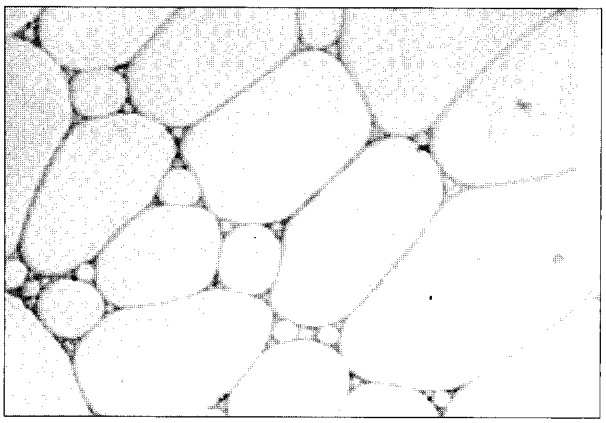

Fig. 1. Light microscopic finding of the groups, with the centrifugation below 3000 rpm below 3 minutes, has intact cell membrane, keep natural cell shape(tryphan blue stain, × 100).

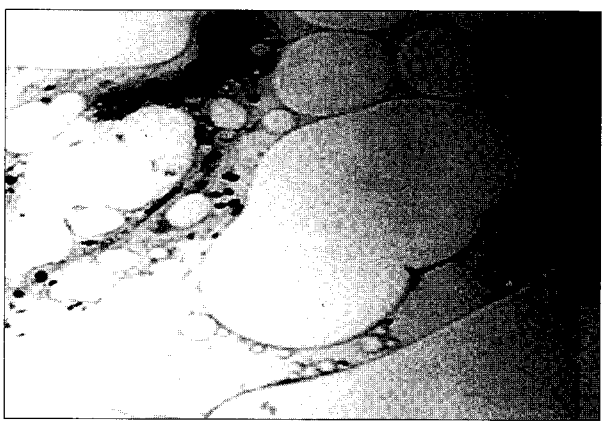

Fig. 2. Light microscopic finding of group III with 1500 rpm/5 minutes centrifugation shows ruptured cell membrane(fusion of cells), and irregular large cell shape(tryphan blue stain, × 100).

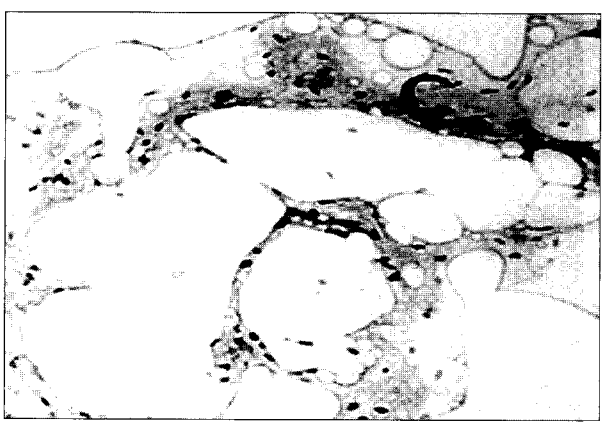

Fig. 3. Light microscopic finding of group III with 5000 rpm/5 minutes centrifugation shows severely ruptured cell membrane(fusion of cells), and irregular large cell shape (tryphan blue stain, × 100).

효과가 거의 반영구적이라는 장점이 있으나, 주입방법이 까다롭고 그 결과를 예측하기 어렵다는 단점이 있다.[4,5] 물론 환자의 비만 정도나 주입한 위치에 따라서 또는 주입하는 양에 따라서도 그 결과가 많은 차이를 가지지만,[6,7] 자가지방을 채취, 정제, 주입하는 과정에서 지방세포가 받는 손상에 따라서도 많은 차이가 난다. 자가지방세포가 받을 수 있는 손상을 살펴보면, 자가지방 채취 전에 주입하는 국소마취용액에 의한 생리적인 손상, 그리고 채취시 걸리는 음압, 정제시 사용하는 원심분리, 그리고 주입시 걸리는 양압에 의한 기계적인 손상을 들 수가 있다.[8] 그 중에서 원심분리의 경우, 상대적 원심력(relative centrifugal force)은 1118 ×(원심분리기의 반경, cm) × (분당회전수, rpm)^2 × 10^{-9}이므로 같은 원심분리기를 사용한다면 원심분리에 의해 걸리는 부하를 결정하는 인자는 원심분리 속도(rpm)와 시간이 된다. 원심분리의 속도와 시간을 증가시킬수록 채취한 지방세포와 섞여 있는 혈장, 국소마취 용액, 지방 외의 기타 물질, 파괴된 지방세포와 주변에 있는 지방 입자에서 나오는 기름(oil)을 분리시켜 좀 더 순수한 지방세포만을 얻을 수 있다는 장점이 있으나 어느 정도 이상의 원심분리는 지방세포 자체에 무리한 부하로 작용하여 손상을 주게 된다.[9]

자가지방 주입의 가장 큰 문제인 지방세포의 생존률을 향상시키기 위한 여러 방법에 대한 연구가 활발해지면서 지방세포의 생존률을 평가하는 방법에 대한 연구도 많이 행하여졌다. 가장 좋은 방법은 각기 다른 조건에서 행하여 얻은 자가지방을 직접 생체에 주입하여 장기적으로 그 결과를 비교 평가하는 방법을 들 수 있겠으나, 우선 현실적으로 불가능하며, 개체간 차이 등의 실험 외적인 요건의 간섭이 심하다는 점, 정량화 된 값이 나오기 힘들기 때문에 많은 개체에서 많은 반복적인 실험을 통한 비교가 필요하다는 점이 있다. 이에 많은 지방세포의 생존률을 평가하는 방법이 실험실에서 행해지고 있는데, 실험동물을 통한 방법, 흡광도를 이용한 방법, 특별한 실험 모델을 만들어 평가하는 방법, 지방세포를 광학현미경 시야에서 직접 관찰하는 방법 등이 있다. 이미 채취한 지방세포는 시간이 지날수록 손상을 받는다는 점을 고려할 때, 주입 전 상태의 지방세포의 생존률을 살펴 볼 수 있는 방법으로 적절한 것에는 흡광도를 이용한 방법, 그리고 현미경 시야에서 살펴보는 방법을 들 수 있다.[10] 그 중에서 흡광도를 이용하게 되면 기계적인 계산이 되어 객관적인 수치가 나올 수 있으나, 생존하는 지방세포보다는 지방세포나, 지방세포의 핵 자체가 흡광도 측정 대상이 되기 때문에 생존률의 측정이라는 점에서 오차가 생길 수 있다. 광학현미경을 이용하여 지방세포를 직접 관찰하는 방법은 살아있는 지방세포를 직접 눈으로 보고 관찰하게 되므로 지방세포의 생존률 계

측이라는 점에서는 좀 더 오차가 적다고 할 수 있다.

그러나, 채취한 자가지방은 세포가 낱낱이 분리되어 있는 것이 아니라, 수백 개의 지방세포가 모여 있는 아주 작은 지방조직 입자로 구성되어 있다. 따라서, 광학현미경 시야에서 그냥 보았을 때 지방세포는 다층의 밀집형태를 이루고 있으므로 그 수를 센다는 것은 불가능하다. 따라서 낱낱의 지방세포로 분리하는 방법이 필요한데, 지방세포의 물리력에 연약한 구조를 생각할 때, 가장 적합한 방법은 생리학적으로 효소를 이용해서 지방세포간의 결합을 끊는 방법을 생각할 수 있다. 이에 본 실험에서는 제 I형 콜라게나제를 이용하였다. 물론 효소에 의한 처리 과정의 경우, 세포간 결합 뿐 아니라 세포자체에도 손상을 주게 된다는 단점이 있다. 이에 본 연구에 앞서 제 I형 콜라게나제의 농도를 각각 다르게 한 상태에서 여러 시간에 걸쳐 배양하면서 지방세포를 관찰한 결과, 적절한 농도와 배양시간을 구할 수 있었다.

지방주입시 지방조직외의 혈장, 마취액, 기름 등의 다른 물질이 섞일 경우 주입 직후의 부피감(volume)이 유지되기 어렵다는 단점이 있다. 따라서 지방조직 정제를 위해서 Coleman 등은 원심분리를 사용하였지만, 원심분리에 의한 지방세포의 손상이 또 다른 문제로 생각되고 있다.[11-13] 그러나 대부분의 경우 임상적인 경험에 의해 원심분리 조건을 정할 뿐이지 특별한 객관적 근거가 없었다. 본 실험에서는 이런 원심분리 환경을 정하는데 대한 객관적인 자료를 제시한다는데 의의가 있다.

V. 결 론

자가지방이식에서 원심분리는 지방만을 집적화하는데 도움을 주지만, 어느 정도의 이상의 원심분리는 지방세포 손상으로 지방 주입 자체의 효율을 오히려 떨어뜨린다. 이에 본 실험에서는 지방의 생존에 영향을 미치지 않는 원심분리 시간과 분당 회전수의 한계 값을 구하기 위하여 원심분리 시간과 회전수를 변화시키면서 현미경 시야에서 생존 지방세포수를 관찰하였다.

분당 회전수 1500에서의 5분 이상 원심분리를 행한 경우와 분당 회전수 3000에서 5분 이상인 경우, 그리고, 분당 회전수 5000에서 1분 이상 원심분리를 행한 경우에는 살아있는 지방세포의 수가 통계학적으로 의미가 있게 낮았으나, 분당 회전수 3000이하에서 3분 이하 원심분리를 행한 경우에서는 통계학적인 차이가 없었다. 원심분리 시간과 분당 회전수가 커질수록 좀 더 집적화된 지방세포를 얻는다는 점을 생각할 때 분당회전수 3000에서 3분간의 원심분리가 가장 효율적이라고 생각된다.

REFERENCES

1. Fenske NA, Lober CW: Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol* 15: 571, 1986
2. Coleman SR: Structural fat graft. The ideal filler? *Clin Plast Surg* 28: 111, 2001
3. Carraway JH, Mellow CG: Syringe aspiration and fat concentration: a simple technique for autologous fat injection. *Ann Plast Surg* 24: 293, 1990
4. Wendt JR: Distal, dorsal superior extremity plasty. *Plast Reconstr Surg* 106: 210, 2000
5. Horl HW, Feller AM, Biemer E: Technique for liposuction fat reimplantation and long term volume evaluation by magnetic resonance imaging. *Ann Plast Surg* 26: 248, 1991
6. Coleman SR: Hand rejuvenation with structural fat grafting. *Plast Reconstr Surg* 110: 1736, 2002
7. Niechajev I, Sevcuk O: Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies. *Plast Reconstr Surg* 94: 496, 1994
8. Carpaneda CA, Ribeiro MT: Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. *Aesthetic Plast Surg* 18: 17, 1994
9. Coleman SR: Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg* 24: 347, 1997
10. Billings E Jr, May JW Jr: Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 83: 368, 1989
11. Chajchir A, Benzaquen I, Wexler E, Arellano A: Fat injection. *Aesthetic Plast Surg* 14: 127, 1990
12. Coleman WP 3rd: Fat transplanatation. *Dermatol Clin* 17: 891, 1999
13. Coleman SR: Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* 19: 421, 1995