

냉동보관된 지방세포의 동종이식

이종훈 · 최홍혁

을지대학교 의과대학 성형외과학교실

Allogenic Grafting of Cryopreserved Fat Cell

Jong Hoon Lee, M.D., Hong Hyeuk Choi, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Eulji University, Daejeon, Korea

Purpose: The most effective methods of harvesting, preparing, and injecting autologous fat grafts have been inconsistent and conflicting. With its limitation as resorption in fat grafting, handling various techniques affect adipocyte survival, and is crucial to optimizing its long-term survival. To improve graft survival, re-implantation of cryopreserved adipocytes was developed. In addition, adipocytes do not induce immune rejection in response to non-self lymphocytes in a mixed lymphocyte reaction. The purpose of this study is to analyze the changes in cryopreserved adipocytes so as to determine the most efficient long-term storage period, and to analyze the changes in cryopreserved allografted adipocytes so as to determine the efficacy of cryopreserved adipocytes allografting.

Methods: Fat tissues were harvested from the inguinal and retroperitoneal fat pad of mice. After the centrifugation of the harvested fat tissues, they were disintegrated with collagenase. The adipocytes were obtained by centrifugation of the disintegrated fat tissues. The adipocytes were treated as follows: (1) They were examined for weight and then frozen at -20°C ($n=25$). For four months, each five frozen samples were taken and examined for weight and histologic changes in the 1st week, the 1st month, the 2nd month, the 3rd month, and the 4th month, respectively. (2) The adipocytes were immediately frozen at -20°C ($n=125$). For four months, five frozen samples were taken, and allografted in the

same time period as above. Finally, for four months, five cryopreserved allografted adipocytes were taken and examined for histologic changes in the same time period as above.

Results: (1) Significant weight changes and histologic findings with inflammatory and destructive changes were observed in the cryopreserved adipocytes in three months. (2) Significant fat necrotic changes in the histologic changes with Hematoxylin and eosin stain were observed in the cryopreserved allografted adipocytes since the first week, independent of the freezing period.

Conclusion: The study results show that the adipocytes that were cryopreserved for more than three months underwent obvious weight reductions and necrotic changes, and the adipocytes that were allografted without freezing were viable for four months, but the cryopreserved allografted adipocytes had obvious necrotic changes since the first week regardless of the freezing period.

Key Words: Allograft, Cryopreservation, Adipocyte

I. 서론

비만 환자가 증가하고 있는 시대에 단지 제거하여야 하는 지방에서 개념을 바꾸어 이를 이용한 다양한 방법을 연구하고 시도할 필요성이 있다. 미용 및 재건 목적의 지방이식도 그 중의 한 방법이 될 것이다.

현재 많이 시행되는 지방이식은 자가지방이식술로 인공보형물에 비해 인체에 안정적인 장점이 있지만 공여부 이환이 문제될 수 있고 및 채취할 수 있는 양이 제한되어 있으며 지방세포의 약 40-60% 정도가 3개월에서 6개월 사이에 서서히 흡수되므로 여러 번의 재수술을 필요로 하는 단점이 있다. 또한 지방세포는 중간엽 줄기세포로부터 유도될 수 있는데 중간엽 줄기세포는 면역 내성과 관련이 있으므로¹ 지방세포 또한 면역 내성과 관련이 있을 것으로 기대할 수 있고² 지방조직 또한 동종이식하여 유방성형술에 이용하였을 때 면역거부반응의 증거를 찾아볼 수 없었다는 보고³도 있으므로 지방세포의 동종이식에 대한 가능성 여부를 제기할 수 있을 것으로 사료된다.

Received December 11, 2007

Revised April 28, 2008

Accepted May 22, 2008

Address Correspondence: Jong Hoon Lee, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Eulji General Hospital, 280-1, Hageye 1-dong, Nowon-gu, Seoul 139-711, Korea. Tel: (02) 970-8255 / Fax: (02) 978-4772 / E-mail: joaljh@eulji.ac.kr

* 본 논문은 2008년 제 64차 대한성형외과학회 학술대회에서 포스터 발표하였음.

일반적으로 자가지방이식의 경우에도 채취된 지방을 보관할 때는 주로 냉동보관을 통해 시행하지만 아직까지 연구가 완전하지 않으므로 동종지방이식의 경우에도 냉동 보관된 지방세포를 체내에 재주입할 때 냉동된 시간에 따른 지방 변화 및 이식 후 생착된 상태에 대한 연관성을 연구하는 것은 매우 중요하다.

동종이식을 이용한 지방이식술이 발전한다면 비만 환자들의 과도한 지방을 채취하여 비만 환자 치료에도 많은 도움을 줄 수 있고 채취된 지방을 다양한 분야에 활용할 수 있게 될 것으로 기대할 수 있으므로 저자들은 동종지방의 냉동보관 기간에 따른 변화 및 냉동동종 지방의 이식 후 생착된 상태에 대해 알아보하고자 한다.

II. 재료 및 방법

가. 냉동보관 기간에 따른 지방세포의 변화에 대한 실험

본 연구는 지방세포를 채취하기 위하여 동종이식 연구를 위한 실험동물 모델로 기존의 연구들에 광범위하게 이용되고 있는 H-2 haplotype이 b인 생후 8주된 C57BL/6 내교배 마우스(C57BL/6MCRljBgi, Orientbio Inc., Korea) 5마리에서 서혜부와 복막 후방부위의 지방조직 5개를 채취하였다. 채취한 지방조직은 5% 요오드로 살균하고 Krebs-Ringer Bicarbonate buffer(Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, K4002)용액으로 2-3번 세척하여 요오드를 제거하였다. 지방조직을 콜만 방식의 원심분리기(Medilite centrifuge, Byron medical, Ariz, USA)를 이용하여 3000 rpm의 조건에서 3분간 원심분리를 시행하였다. 원심분리하여 상층의 지질(oil)과 파괴된 세포 파편들(cell debris), 중간층의 지방세포가 다량 함유된 지방세포층, 하층의 혈액 및 액체 성분으로 분리하였다. 상층과 하층 부분을 제거하고 남은 지방조직층에서 지방조직을 얻은 후 생리식염수 2 mL와 혼합한 후 제 1형 콜라게나제 용액(0.45% Serva Collagenase, Promega Co., USA) 1 mL을 첨가하여 균일하게 혼합한 후, 38.6°C에서 2시간 조직분해하였다. 조직분해된 지방조직을 3000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층의 지질을 제외한 중간층의 지방세포층을 취하여 무게를 측정하고 Hematoxylin and eosin 염색을 통한 조직학적 상태를 관찰한 5개를 대조군으로 하였다. 대조군의 처리 과정은 원심분리 후 분리 수집된 지방세포층의 무게를 측정하고 다시 3000 rpm으로 3분간 원심분리 후 무게 측정을 하여 무게 변화를 관찰하고자 하였는데, 이는 채취 당시 취약한 지방세포가 외부 압력에 의해 단순 파괴된 결과로 간주하였다.⁴ 실험군으로 다른 25마리에서 채

취한 지방조직 25개를 조직분해 및 원심 분리하여 얻은 지방세포층의 무게를 측정된 후 지방세포의 가장 효과적인 보관 온도로 알려진 영하 20°C로 냉동고(Operon, iso 9001, Korea)에 냉동보관하였다.⁵ 각각 5개씩 냉동보관 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 경과 후 보관된 지방세포층을 실온에서 자연 해동하여 원심분리한 후 무게를 측정하여 냉동 전 무게와 비교하여 지방세포의 감소된 무게 비율의 평균과 표준편차를 구하였고, Hematoxylin and eosin 염색을 통한 조직학적 변화를 대조군과 비교하여 냉동보관에 따른 변화 및 지방세포에 미치는 냉동보관의 안전성 여부, 냉동보관의 효과적인 보관시기 등을 연구하고자 하였다. 조직학적 관찰은 각 군의 지방세포층을 Hematoxylin and eosin 염색하여 100배 광학현미경으로 관찰하여 전체 지방세포들에 대한 정상적인 지방세포와 비전형적인 지방세포의 비율을 측정하는 방법으로 시행하였으며 지방괴사가 없으면 (-), 20% 미만 (1+), 20-40% (2+), 41-60% (3+), 61-80% (4+), 81-95% (5+), 96% 이상이면 (6+)로 표시하여 비교하였다. 연구결과의 통계학적 분석은 SPSS version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.)을 이용한 ANOVA test와 t-test를 이용하여 검정하였고 95% 신뢰도 구간에서 $p < 0.05$ 인 경우를 의미있는 결과로 보았다.

나. 냉동 동종지방이식의 생체 변화에 대한 실험

대조군으로 25마리에서 냉동보관 기간에 따른 변화를 알아보기 위한 실험 때와 같은 방법으로 지방조직을 채취하고 조직분해 및 원심 분리하여 얻은 지방세포층 25개를 각각 다른 25마리의 마우스에게 흉골 위 피하로 18G 주사기 바늘을 이용하여 이식하고 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 경과 후 각각 5마리의 이식 부위를 생검하여 Hematoxylin-eosin 염색을 통한 조직검사를 시행하여 이식 후 지방세포의 변화를 관찰하였다. 실험군으로 125마리에서 얻은 지방세포층을 각각 25개씩 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 냉동보관한 후, 기간에 맞춰 자연 해동시킨 지방세포층 25개를 마우스 흉골 위 피하에 이식하고 각각 5마리씩 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월 경과 후 이식 부위를 생검하여 얻은 지방조직을 Hematoxylin-eosin 염색을 통한 조직검사를 시행하여 냉동보관 후 이식된 지방세포의 변화를 대조군과 비교하여 냉동보관 후 이식된 지방세포의 생착 상태에 대한 변화를 관찰하고 냉동지방의 보관 시기 및 생착률과의 연관성에 대해 연구하고자 하였다. 생검한 지방조직을 육안적인 관찰과 조직학적 관찰을 시행하여 비교하고자 하였으며 조직학적 관찰은 각 군의 지방세포층을 Hematoxylin-eosin 염색하여 100배 광학현미경으로 관

찰하여 전체 지방세포들에 대한 정상적인 지방세포와 염증반응이나 비전형적인 지방세포가 나타나는 지방괴사의 비율을 측정하는 방법으로 시행하였으며 지방괴사가 없으면 (-), 20%미만 (1+), 20 - 40% (2+), 41 - 60% (3+), 61 - 80% (4+), 81 - 95% (5+), 96%이상이면 (6+)로 표시하여 비교하였다. 연구결과의 통계학적 분석은 SPSS version 11.0(SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.)을 이용한 다차원 변량분석 GLM-UNIVARITE test를 이용하여 검정하였고 95% 신뢰도 구간에서 $p < 0.05$ 인 경우를 의미있는 결과로 보았다.

III. 결 과

가. 냉동보관 기간에 따른 변화에 대한 실험

1) 감소된 지방세포층 무게 비율의 측정

냉동기간에 따른 지방세포층의 무게 변화는 대조군의 경우 0.03%였고, 실험군의 경우 영하 20℃에서 냉동 1주, 1-4개월이 경과된 무게 변화는 각각 0.11%, 0.25%, 0.49%, 2.39%, 4.27%로 나타났다(Table I). 냉동기간에 따른 지방세포층의 무게 비율에 대해서 one-way ANOVA test로 분석한 결과 F값은 45.454($p < 0.05$)로서 유의한 차이를 보였으며 Scheffe의 사후검증과 t-test 결과 $p < 0.05$ 로서 냉동 3개월 이후부터 지방세포층의 무게 비율이 뚜렷하게 차이를 보이는 것으로 나타났다.

Table I. Decreased Weight of Adipocyte During Freezing Period(% g)

2) 지방세포의 형태학적 분석

조직학적 관찰을 통한 형태학적 분석을 시행할 때 지방세포들이 비교적 등근 형태를 유지하고 전체적인 세포들의 배열은 불규칙적이기도 하며 군데군데 loose collagen이 일부 관찰되는 것을 정상적인 지방세포라고 판단하였고,⁶ 지방세포들 주변으로 histiocyte, neutrophil

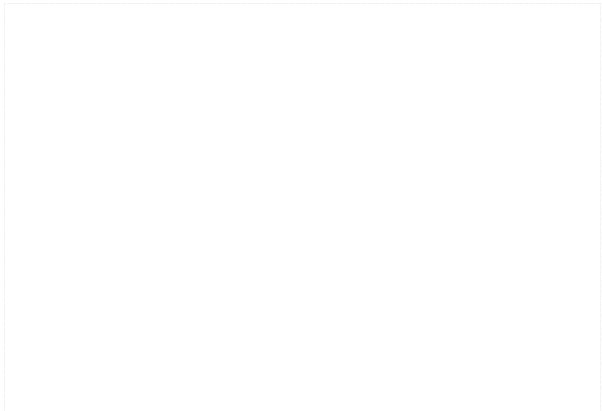


Fig. 1. Normal fat cells (Hematoxylin and eosin stain, × 400). Histologic findings of adipocytes without freezing. The adipocytes with round vacuole are well preserved.



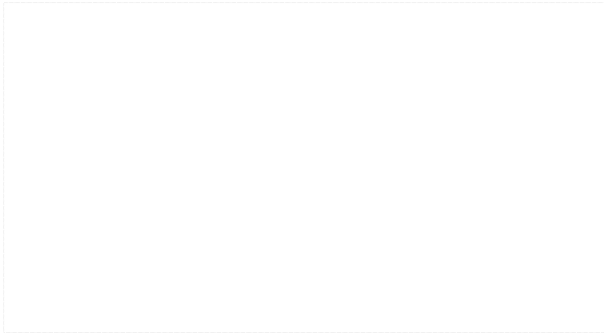
Fig. 2. The necrotic fat cells (Hematoxylin and eosin stain, × 400). Histologic findings of adipocytes that is taken at 2 month with freezing. It is evaluated as fat necrosis grade (1+) in × 100. Left upper and lower area shows histiocytic infiltrates between adipocytes representing focal fat necrosis. Right side adipocytes are still alive.

등이 침윤되어 염증성 반응이 나타나고 액화성 괴사가 관찰되면 지방괴사가 발생한 것으로 판단하였다(Fig. 1, 2).

대조군의 경우 대부분 염증반응이나 세포막의 파괴 없이 지방세포의 등근 형태를 유지하고 있었으므로 지방괴사가 나타나는 비율에 대한 등급은 (-)였으며, 실험군의 경우 냉동기간에 따른 지방괴사가 나타나는 비율에 대한 등급은 1주 (0.40+), 1개월 (0.80+), 2개월 (1.20+), 3개월 (3.00+), 4개월 (3.40+)로 평가되었다(Table II). 냉동기간에 따른 지방세포의 괴사가 나타나는 비율에 대해서 one-way ANOVA test로 분석한 결과 F값은 39.573($p < 0.05$)로서 유의한 차이를 보였으며 Scheffe의 사후검증과 t-test 결과 $p < 0.05$ 로서 냉동 3개

월 이후부터 지방괴사 비율이 뚜렷하게 차이를 보이는 것으로 나타났다.

Table II. The Grade of Fat Necrosis During Freezing Period



*The grade of fat necrosis

0: fat necrosis is none

1+: < 20%

2+: 21 - 40%

3+: 41 - 60%

4+: 61-80%

5+: 81 - 95%

6+: > 96%

나. 냉동 동종지방이식의 생태 변화에 대한 실험

육안적 관찰에서 대조군의 경우 이식 후 1주부터 4개월까지 기간에 따라 생착된 양은 차이가 있었으나 이식된 기간에 관계없이 모든 검체에서 마우스에서 채취한 직후의 지방과 같은 노란 지방색깔이 나타나는 정상적인 지방조직의 형태가 유지되었다. 실험군의 경우 냉동기간에 관계없이 이식한 후 3개월 이후에는 지방조직의 형태를 관찰할 수 없었으며 이식 후 3개월 이전에도 지방괴사로 인해 지방조직을 발견할 수 없거나 생착된 양이 많이 감소되어 있는 양상을 보였다(Fig. 3, 4).

조직학적 관찰에 의한 형태학적 분석은 냉동보관 기간에 따른 지방세포의 변화에 대한 연구에서 시행한 방법과 같이 지방괴사가 발생한 비율을 평가하여 판단하였다. 대조군의 경우 이식 후 4개월까지 지방괴사가 많이 진행되지 않은 양상으로 대부분 (4+) 이하로 평가되었으나 실험군의 경우 냉동기간에 관계없이 지방괴사

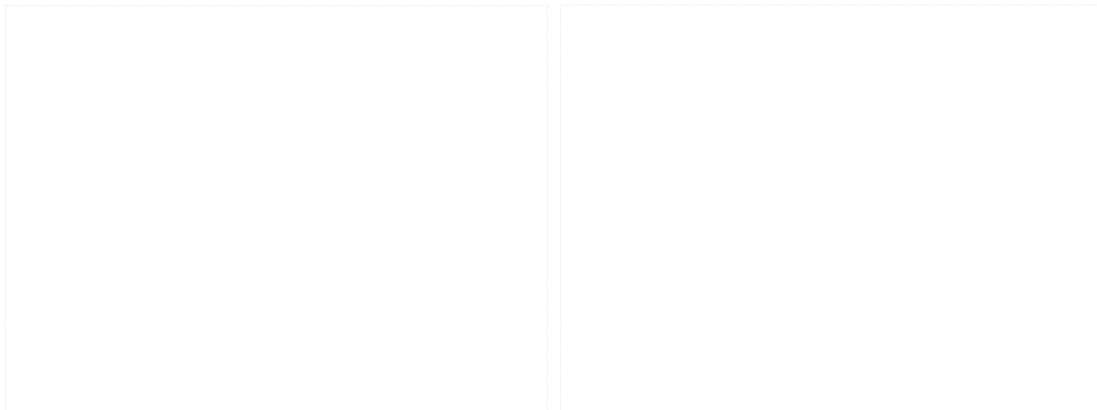


Fig. 3. The allografted fat cells in 4 months without freezing. (Left) There is a yellowish and isolated fat tissue in the subcutaneous tissue on the back of C57BL/6 mice. The fat cells are allografted for 4 months. (Right) The allografted fat cells are harvested. The fat tissue is taken on a normal fat tissue aspect.

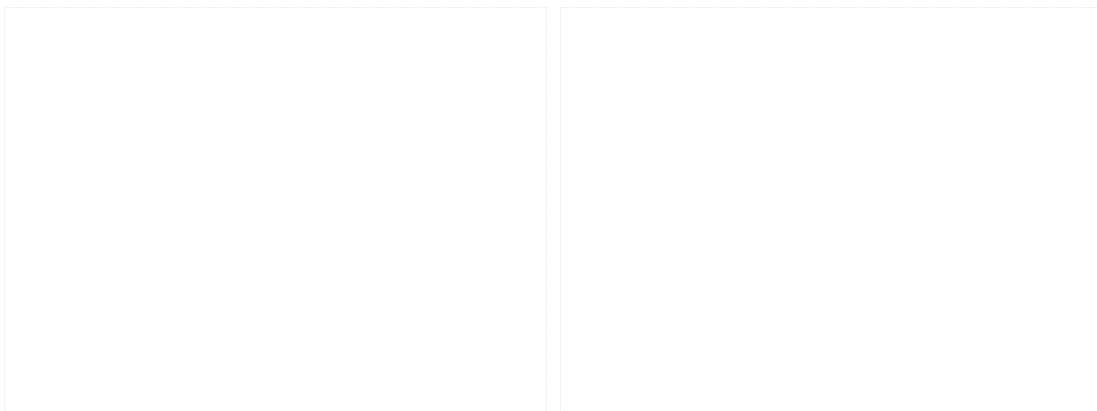


Fig. 4. The allografted fat cells for 1 week with freezing for 2 months. (Left) There is a necrotic and ill-circumscribed fat tissue in the subcutaneous tissue on the back of C57BL/6 mice. (Right) The allografted fat cells are harvested. The fat tissue is taken on a inflammatory aspect.

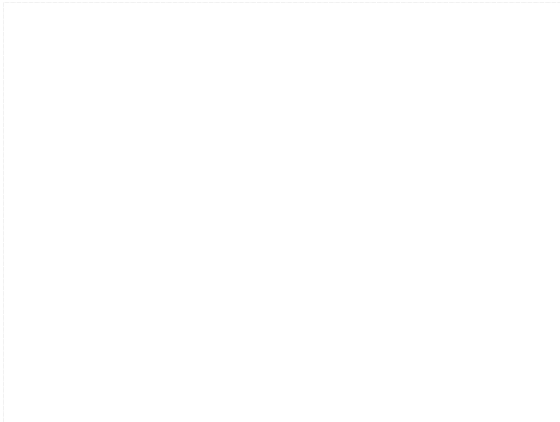


Fig. 5. The non-cryopreserved allografted fat cells (Hematoxylin and eosin stain, ×400). Histologic findings of adipocytes that is taken in 2 months after allografting. There are diffuse histiocytic infiltrates representing fat necrosis. It is evaluated as fat necrosis grade (4+) in ×100.

가 많이 진행된 양상으로 대부분 (4+) 이상으로 평가되었다(Fig. 5 - 8).

대조군에서 이식기간에 따른 지방괴사가 나타나는 비율에 대한 등급은 1주 (1.20+), 1개월 (2.80+), 2개월 (3.20+), 3개월 (3.60+), 4개월 (4.20+)로서(Table III), one-way ANOVA test로 분석한 결과 F값은 29.123($p<0.05$)로서 유의한 차이를 보였으며, Scheffe의 사후검증과 t-test 결과 $p<0.05$ 로서 이식 1개월 이후부터 지방괴사 비율이 뚜렷한 차이를 보이는 것으로 나타났다.

실험군에서 냉동기간 및 이식기간에 따른 지방괴사가 나타나는 비율에 대한 등급은 Table IV와 같이 평가되었다.

대조군과 실험군을 다차원 변량분석 GLM-UNIVARITE test로 분석한 결과 냉동 후 이식기간에 따른 각각의 평균의 차이는 $p<0.05$ 로서 유의한 차이를 보였으며 Scheffe의 사후검증 결과 대조군과 냉동 1주, 냉동 1개월부터 4개월

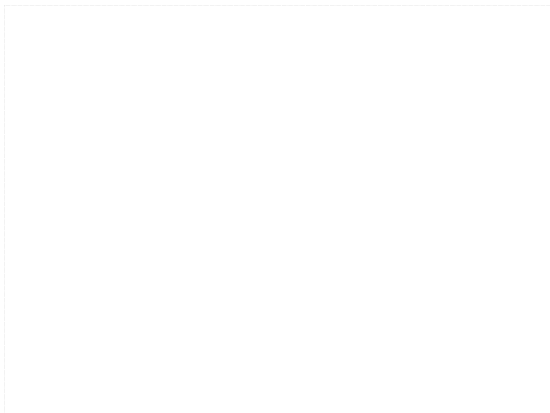


Fig. 6. The cryopreserved allografted fat cells (Hematoxylin and eosin stain, ×400). Histologic findings of adipocytes that is taken in 1 month after allografting with freezing for 1 month. Total liquefactive necrosis is evident. It is evaluated as fat necrosis grade (6+) in ×100.



Fig. 7. The cryopreserved allografted fat cells (Hematoxylin and eosin stain, ×400). Histologic findings of adipocytes that is taken in 1 month after allografting with freezing in 4 months. In the periphery, there are diffuse histiocytic and neutrophilic infiltrates. It is evaluated as fat necrosis grade (6+) in ×100.

Table III. The Grade of Fat Necrosis During Allografting Period without Freezing

	<p>*The grade of fat necrosis</p> <p>0: fat necrosis is none</p> <p>1+: < 20%</p> <p>2+: 21 - 40%</p> <p>3+: 41 - 60%</p> <p>4+: 61 - 80%</p> <p>5+: 81 - 95%</p> <p>6+: > 96%</p>
--	--

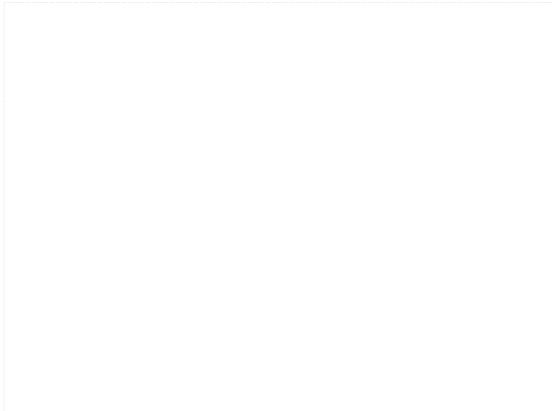


Fig. 8. The cryopreserved allografted fat cells (Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$). Histologic findings of adipocytes that is taken in 4 months after allografting with freezing in 1 month. The center shows liquefactive necrosis and the periphery shows inflammatory rimming. It is evaluated as fat necrosis grade (6+) in $\times 100$.

Table IV. The Grade of Fat Necrosis During Allografting Period with Freezing

*The grade of fat necrosis	
0: fat necrosis is none	
1+: <20%	2+: 21 - 40%
3+: 41 - 60%	4+: 61 - 80%
5+: 81 - 95%	6+: >96%

까지의 기간별로 이식된 지방세포의 조직학적 변화가 차이가 있는 것으로 나타났다(F=39.573). 따라서 냉동하지 않고 이식한 지방세포에 비해 냉동 후 이식한 지방세포는 냉동 1주 이후부터도 지방괴사가 발생한 정도가 더 뚜렷하게 차이를 보이는 것으로 나타났다.

IV. 고 찰

최근 서구화된 식습관이나 생활 방식 등에 의해 비만 환자가 증가하고 개인적으로나 사회적으로도 비만에 대한 관심이 증가하면서 비만의 치료 및 그에 따른 지방 제거에 대한 관심이 증가하고 있다. 비만 및 지방 제거를 위한 사회, 경제적 비용이 증가하고 있는 시대에 단지 제거하여야 하는 지방에서 개념을 바꾸어 이를 이용한 다양한 방법을 연구하고 시도할 필요성이 있다. 미용 및 재건 목적의 지방이식도 그 중의 한 방법이 될 것이다. 특히 성형외과 분야에서 연부조직의 보정을 위해 지방이식이 사용되는 경우가 많은데 현재 많이 시행되는 지방이식은 자가지방이식술이다. 그러나 공여부 이환율과 양적인 한계가 있는 것이 사실이며 자가지방 이식의 조건에 따라 흡수율 차이가 많아 그 결과를 예측할 수 없으며 이식된 지방세포의 약 50% 정도가 3개월에서 6개월 사이에 서서히 흡수되므로 여러 번의 재수술을 필요로 하는 단점이 있어 지방세포의 생착률을 최대한 높이기 위한 지방세포의 채취, 분리 및 재주입 과정에 대한 연구가 많이 이뤄지고 있으며, 채취된 자가지방의 일부를 냉동보관한 후 일정시간이 경과된 뒤 재주입하는 방법이 시행되고 있다. 일반적으로 채취된 지방을 보관할 때는 주로 냉동보관을 통해 시행하지만 아직까지 연구가 완전하지 않아 냉동 보관된 지방세포를 체내에 재주입할 때 냉동된 시간에 따른 지방 변화 및 이식 후 생착된 상태에 대한 연관성을 연구하는 것은 매우 중요하다. 그러므로 지방세포에 적합한 냉동조건에 대한 연구뿐만 아니라 냉동보관된 지방의 재주입 시 생착률을 높이기 위한 냉동지방의 변화에 대한 연구가 많이 시행되고 있다.⁴ 뿐만 아니라 공여부 이환율과 양적인 한계의 단점을 극복하기 위한 방법으로 분화된 지방세포를 이용한 조직 공학적 방법에 대한 연구도 진행되고 있으나,^{7,8} 분화된 지방세포의 자가지식은 다른 자가지식 세포치료제와 같이 환자 개개인에 대해 맞춤형 치료가 필요하므로 생산비용이 많이 들고 적용범위가 한정되는 단점이 있어 시행하는 것은 현재는 한계가 있다. 이에 비해 동종지방의 경우 대량으로 채취가 가능하므로 동종지방이식에 대한 관심을 가질 필요가 있다고 사료된다.

동종지방이식의 경우에도 다른 조직의 동종이식과 마찬가지로 면역거부반응이 큰 장애가 될 수 있는데, 지방세포는 중간엽 줄기세포로부터 유도될 수 있으며 중간엽 줄기세포는 세포 표면에서 제 2급 조직적합성 단백질의 발현이 제한되어 있고 림프구세포와 공동 배양하여 혼합 림프구 반응을 실시하였을 때 림프구 세포의 증식을 억제한다고 알려져 있으므로¹ 지방세포 또한 면역 내성과 관련이 있을 것으로 기대할 수 있다.² 또한 1988년도에 보고된 문헌에 의하면 동종 지방조직을 이용한 유방확대 성형수술을 시행한 러시아 여성들에게서 지방조직을 제거하는 수술을 시행하였을 때 동종지방이식에 대한 면역거부반응의 증거를 찾아볼 수 없었다는 보고³도 있으므로 동종이식에 대한 가능성 여부를 고려할 수 있을 것으로 사료된다.

저자들의 실험에서도 냉동하지 않고 채취한 지방세포를 동종이식 하였을 때 이식 후 4개월까지도 육안적인 관찰에서는 이식된 마우스의 피하 부위가 특별한 염증반응이나 괴사된 흔적이 없이 부피감을 느낄 정도의 용기된 상태로 관찰되었고 조직학적 검사에서도 약 30% 정도 괴사되지 않고 생존해 있는 지방세포가 관찰되었다. 3개월까지는 지방괴사가 약 50% 정도만이 발견되었으므로 지방세포의 면역내성 가능성과 동종지방이식을 시행하였을 때 면역거부반응의 감소 등을 기대할 수 있으나 자가지방이식과의 비교 실험이 시행되지 않았고 육안적 검사 및 조직학적 검사만으로는 실제 동종이식된 지방세포의 면역학적 거부반응에 대한 정상 변화와 일치하는지 알 수 없으므로 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다. 하지만 동종이식된 지방세포의 생존률을 증가시킬 수 있는 연구가 시행된다면 자가지방이식으로 시행되고 있는 여러 분야에도 많이 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

현재까지 동종지방이식을 위한 냉동조건이나 냉동지방의 동종이식에 대한 연구는 미미한 상태이므로 저자들은 마우스에서 지방을 채취하여 냉동보관 후 동종이식하는 방법으로 동종지방의 냉동보관기간에 따른 변화 및 냉동지방의 동종이식 후 생착 상태에 대해 알아보려고 하였다.

지방세포는 영하 20℃ 완속냉동(slow freezing) 시에 7일까지 보관 시 한랭손상을 최소화할 수 있어 지방세포의 미토콘드리아 활성이 유지되며,⁵ 냉동보관을 하지 않은 경우 지방세포의 미토콘드리아 활성이 보관 7일 이내에 70% 이상 감소하는 실험 결과를 토대로 영하 20℃가 지방세포의 가장 효과적인 냉동보관 온도로 알려져 있어⁴ 저자들은 원심분리된 지방세포를 영하 20℃ 냉동고에 보관하여 실험하였다.

김유경 등⁴은 1개월 이상 장기간 냉동 보관된 지방세포의 변화 및 효과적인 보관기간에 대한 연구에서 영하 20℃에서 냉동 보관된 지방세포의 육안적 무게 변화는 냉동 1, 2개월 동안은 적으나 냉동 3개월째 이르러 급속한 감소를 보이고, 냉동 3개월 이후에는 추가적인 감소가 없었으며, 지방세포에 대한 직접적인 관찰에서도 냉동보관 5, 6개월까지도 지방세포의 형태학적 모양이 흡입직후의 지방세포의 모양과 유사하게 보이고 세포부산물 성분분석 결과와 일치하므로 영하 20℃에서 냉동보관이 안전하고 효과적인 방법이며 지방이식은 냉동보관 3개월 이전의 지방세포를 이용하는 것이 효과적이라고 보고하였다.

저자들의 경우에서도 냉동보관 3개월 이후부터는 부피 변화가 뚜렷하게 나타났고 조직학적 검사에서도 지방괴사 비율이 뚜렷하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 무게 변화 자체는 4개월까지 약 4% 정도로 관찰되었고 지방괴사도 4개월까지 대부분 50% 이하, 2개월까지는 20% 미만으로 나타났으며, 지방괴사없이 생존하고 있는 지방세포의 형태도 그대로 유지하는 양상을 보였으므로 냉동보관 자체가 지방세포의 변성을 유발하지는 않지만 냉동보관된 지방세포를 이식하는 것은 3개월 이전의 지방세포를 이용하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 그러나 냉동보관된 지방의 동종이식에 대한 실험에서 냉동보관하지 않은 지방의 동종이식에서는 육안적 관찰이나 조직학적 관찰에서도 무게 감소나 지방괴사 정도가 적은 양상으로 나타나 지방세포의 면역내성 가능성과 동종지방이식을 시행하였을 때 면역거부반응의 감소 등을 기대할 수 있었으나, 냉동보관한 지방세포의 동종이식에서는 마우스의 피하 부분에 용기된 흔적을 찾아볼 수 없었고 조직학적 검사에서도 냉동보관기간에 관계없이 대부분의 지방세포들에게 지방괴사가 발생하는 것으로 나타났다. 이것은 동종지방이식의 경우 냉동보관 시에 발생하는 지방세포의 세포막이나 미토콘드리아 막의 파괴 등으로 더 많은 세포손상을 증가시키기 때문인 것으로 사료된다. 일반적으로 이식된 지방세포의 흡수는 취약한 지방세포가 파괴되어 세포수의 감소가 일어난 후 파괴된 지방세포에서 유출된 지질 성분이 흡수되어 최종적인 부피감소가 일어나는 것이므로 살아있는 세포의 수와 지방세포의 형태 및 부피 유지 모두가 이식된 지방세포의 생착에 중요한데,^{9,10} 세포손상 중 가역적 세포손상은 세포부종, 미토콘드리아 팽윤 및 세포형태의 변화가 나타나지만 아직 세포막의 파괴는 없는 상태이며, 비가역적 세포손상은 세포막의 파괴 및 미토콘드리아 막의 파괴가 있는 상태로서 세포손상의 가역성을 결정하는 것은 세포막의 보존 여부가

매우 중요하다는 것에 기인한다.⁴ 그러므로 지방세포를 냉동보관 후 동종이식을 하기 위해서는 냉동보관 기간, 냉동보관의 조건 및 동종이식하는 방법 등을 개선하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되며 또한 자가지방이식의 경우에도 냉동보관 후 이식하는 경우에는 안전성에 대해 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

자가지방이식술이 분화된 지방전구세포를 이용하거나 줄기세포를 이용한 자가지방이식술 등과 같은 많은 발전을 하고 있고 동종이식의 면역거부반응에 대한 뚜렷한 해결 방법이 없어 동종이식을 이용한 지방이식술의 활용은 현재까지 많은 제한이 있어도 향후 성형외과 영역에서 다양한 방법으로 동종이식방법을 개발할 가치가 있고 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

동종이식 연구를 위한 실험동물 모델로 기존의 연구들에 광범위하게 이용되고 있는 H-2 haplotype이 b인 C57BL/6 내교배 마우스에서 채취한 지방세포는 냉동보관 4개월까지도 부피변화가 약 4% 정도, 지방괴사가 50% 이하였으며 지방괴사없이 생존하고 있는 지방세포의 형태는 그대로 유지하는 양상을 보였으나 3개월 이후부터 무게 변화가 뚜렷하게 나타났고 조직학적 검사에서도 지방괴사 비율이 뚜렷하게 증가하는 것으로 나타났다으므로 냉동보관 자체가 지방세포의 변성을 유발하지는 않지만 냉동보관된 지방세포를 이식하는 것은 3개월 이전의 지방세포를 이용하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

냉동보관하지 않은 지방의 동종이식에서는 육안적인 관찰에서 이식 후 4개월까지도 이식된 마우스의 피하 부위가 부피감을 느낄 정도의 용기된 상태로 관찰되었고 조직학적 검사에서도 3개월까지는 지방괴사가 약 50% 정도만이 발견되어 지방세포의 면역내성 가능성과 동종지방이식을 시행하였을 때 면역거부반응의 감소 등을 기대할 수 있었으나, 냉동보관한 지방세포의 동종이식에서는 마우스의 피하 부분에 용기된 흔적을 찾아

볼 수 없었고 조직학적 검사에서도 냉동보관기간에 관계없이 대부분의 지방세포들에게 지방괴사가 발생하는 것으로 나타났다으므로 동종지방이식의 경우 냉동보관 후 이식하는 것은 좀 더 개선된 방법이 개발되어야 할 것으로 사료되며 또한 자가지방이식의 경우에도 지방세포의 냉동보관에 대한 안전성여부 뿐만 아니라 냉동보관 후 이식을 시행하는 방법의 안전성에 대한 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. 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
2. Kim IO, Kim TS, Kim MH, Hyon WS, Mun GH, Oh KS, Bang SI: Differentiation and labeling of mouse preadipocytes for allogenic transplantation study. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 533, 2005
3. Rosen PB, Hugo NE: Augmentation mammoplasty by cadaver fat allografts. *Plast Reconstr Surg* 82: 525, 1988
4. Kim YK, Park HS, Lee HJ: Studies on the proper storage period and change of -20°C cryopreserved adipocyte. *J Korean Soc Aesth Plast Reconstr Surg* 12: 33, 2006
5. Sommer B, Sattler G: Current concepts of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg* 26: 1159, 2000
6. De Souza Pinto EB, da Silva Moia SM, Machado MN, Pereira ST: Morphologic analysis of fat tissue in areas treated with lipoplasty. *Aesthetic Surg J* 22: 513, 2002
7. Deans RJ, Moseley AB: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28: 875, 2000
8. Bosi A, Bartolozzi B, Guidi S: Allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 37: 2667, 2005
9. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA: In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 113: 391, 2004
10. Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ: Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg* 109: 761, 2002