

배양하지 않은 지방조직세포를 이용한 창상피복

서동린 · 한승규 · 전경욱 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Clinical Application of Adipose Derived Stromal Cell Autograft for Wound Coverage

Dong-lin Seo, M.D., Seung-Kyu Han, M.D.,
Kyung-Wook Chun, M.D., Woo-Kyung Kim, M.D.

Department of Plastic Surgery, Korea University College of
Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Skin and soft tissue defect is one of the major challenges faced by plastic surgeons. Adipose derived stromal cells, which can be harvested in large quantities with low morbidity, display multilineage mesodermal potential. Therefore, adipose derived stromal cells have been met with a great deal of excitement by the field of tissue engineering. Recently, Adipose derived stromal cells have been isolated and cultured to use soft tissue restoration. In order to apply cultured cells for clinical purpose, however, FDA approved facilities and techniques are required, which may be difficult for a clinician who cultures cells in a laboratory dedicated to research to utilize this treatment for patients. In addition, long culture period is needed. Fortunately, adipose derived stromal cells are easy to obtain in large quantities without cell culture. The purpose of this study is to present a possibility of using uncultured adipose derived stromal cells for wound coverage.

Methods: Seven patients who needed skin and soft tissue restoration were included. Five patients had diabetic foot ulcers, 1 patient got thumb amputation, and 1 patient had tissue defect caused by resection of squamous cell carcinoma. The patients' abdominal adipose tissues were obtained by liposuction. The samples were digested with type I collagenase and centrifuged to obtain adipose derived stromal cells. The isolated adipose derived stromal cells were applied over

the wounds immediately after the wound debridement. Fibrin was used as adipose derived stromal cells carrier. Occlusive dressing was applied with films and foams and the wounds were kept moist until complete healing.

Results: One hundred to one hundred sixty thousand adipose derived stromal cells were isolated per ml aspirated adipose tissue. All patients' wounds were successfully covered with the grafted adipose derived stromal cells in a 17 to 27 day period. No adverse events related to this treatment occurred.

Conclusion: The use of uncultured adipose derived stromal cells was found to be safe and effective treatment for wound coverage without donor site morbidity.

Key Words: Wound healing, Uncultured adipose derived stromal cells

I. 서 론

콜이나 건조직이 노출된 피부와 연부조직의 결손은 외상이나 감염 및 종양 수술 후에 주로 생기는 것으로, 많은 성형외과 의사들에게 도전 과제를 주고 있다. 결손 부위를 재건하기 위해서는 손상된 피부 및 연부조직과 유사한 조직을 결손부위에 생착시키는 방법이 필요하다. 흔히 시행되는 피부 및 연부조직의 재건을 위한 방법으로 피판술이 있으나 국소피판술의 경우는 피판의 양과 구성 및 이동 범위에 한계가 있으며, 유리피판술은 수술과정이 복잡하며, 수술시간도 많이 걸리고, 공여부 손실이 크다는 불리한 점이 있다.¹ 또한 당뇨족 등 만성 창상의 경우는 많은 환자에 있어 전신상태가 좋지 않고 조직의 혈액 순환이 여의치 않아 피판술을 시행하기 어렵다.

최근 조직 공학의 발달로 세포를 분리, 배양하여 재건할 조직을 만드는 방법이 시행되고 있다. 특히 지방조직 세포는 비교적 간단한 방법으로 상당한 양을 공여부의 손실을 최소화 하며 얻을 수 있어, 지방조직에서 지방조직세포(Adipose derived stromal cells)를 분리하여, 세포 배양과 분화를 통해 이를 연부조직에 재건에 사용하려는 노력이 있다.² 하지만 임상적으로 배양한 세포를

Received April 2, 2008

Revised May 29, 2008

Accepted June 20, 2008

Address Correspondence: Seung-Kyu Han, M.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Guro Hospital, 97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea. Tel: (02) 2626-3333 / Fax (02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

* 본 논문은 2007년 제63차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 구연발표 되었음.

사용하기에는 극복해야 할 몇 가지 문제점이 있다. 식약청에서 인정한 배양설비 및 방법을 갖추고, 치료과정에 대한 식약청의 허가를 받아야 하기 때문에 일반적인 임상 의사들이 시행하기에는 어려움이 크며, 또한 세포배양에는 상당한 시간이 소요되어 치료가 즉각적으로 필요한 환자에게 즉시 사용하지 못하는 단점이 있다. 이에 본 교실에서는 지방조직은 공 여부 희생 없이 지방조직 세포를 상당량 쉽게 얻을 수 있다는 점에 착안하여 배양하지 않는 지방조직 세포를 이용한 창상피복의 가능성에 대해 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

가. 대상

2007년 5월부터 2007년 9월까지 본원에 입원한 당뇨병 5례, 우측 무지 원위부 수지의 부분 절단 1례, 좌측 무지구 편평 상피 세포 암 절제술 시행한 환자 1례 등, 총 7명의 환자를 대상으로 하였다. 특히 당뇨병 환자는 모두 기존의 방법으로 3개월 이상 치료를 하였으나 회복되지 못한 경우였다. 환자의 나이는 50세에서 76세였고, 남자 5명, 여자 2명 이었다. 본 연구는 연구자들이 속해 있는 기관의 윤리 위원회의 심사를 통과 하였으며 연구에 조직을 제공한 환자들 모두 충분한 설명을 듣고 기꺼이 연구 참여에 동의하였다.

나. 지방조직 세포의 분리

환자의 하복부에서 통상적인 방법인 지방세포흡입법으로 지방조직세포의 얻고, 50 mL tube에 획득한 지방조직을 생리 식염수로 2회 세척(cell washing)하였다. 세척된 지방조직을 IA형의 교원질 분해효소(Collagenase type IA; Sigma, Missouri 63178, USA)와 phosphate buffered saline(PBS; Gibco, Carlsbad, U.S.A.)이 혼합된 용액으로(3.5 mg/10 mL) 30분간 CO₂ 항온 배양(incubation)시켜 지방조직에서 지방조직세포를 분리해냈다. 지방조직세포가 포함된 용액을 100 μm의 필터를 통해 여과하여 부유물을 제거하고 필터를 통해 걸러진 용액을 450 μg에서 17분간 원심 분리하여 4개의 층으로 분리하였는데, 분리된 각 층은 위에서 첫 번째 지방조직 층, 두 번째 부유물 층, 세 번째 지방조직세포층, 가장 아래의 적혈구 층 등이다. 상층부의 두 개의 층을 제거한 후, 사염화탄소를 투여 하고 10분간 실온에 방치한 후, 450 μg에서 17분간 다시 원심 분리하여 적혈구 침사층을 제거하고 지방조직세포를 분리하였다. 분리된 세포를 확인하기 위해서 트리판블루(trypan blue)로 염색 후 헤마토타이트미터(hemocytometer) 위에서 지방조직세포 수

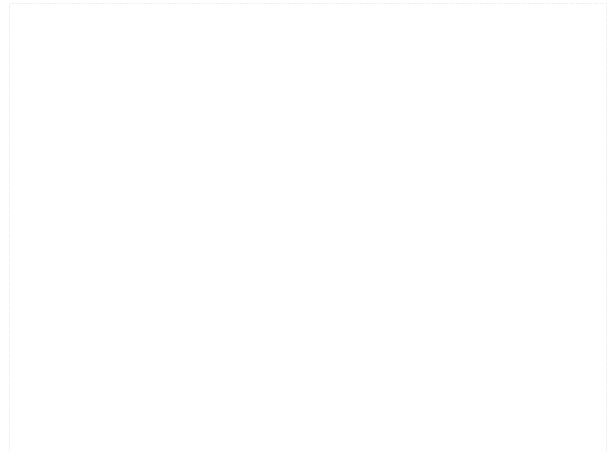


Fig. 1. Adipose derived stromal cells were dyed with trypan blue and seen through hemacytometer.

를 계수하였다(Fig. 1).

다. 수술방법

지방조직으로부터 단순 분리된 배양하지 않은 지방조직세포를 창상의 변연절제술 후 창상에 섬유소아교(Fibrin glue; Baxter, Vienna, Austria)를 운반체로 하여 직접 도포하였다. 당뇨병 환자는 변연절제술 시행 후, 외상으로 무지 원위부 수지 절단된 환자와 종양제거 환자는 수상 직후와 종양제거 후 지방조직세포이식술을 시행하였다. 지방조직세포를 도포한 후 창상에는 필름 형태의 드레싱을, 창상 주변에는 폼 형태의 드레싱을 시행하여 이식한 세포들이 압력을 받지 않도록 밀봉하였다(Fig. 2). 수술 후 드레싱은 1주일에 2-3회 시행하였으며 창상이 재상피화가 될 때까지 습윤한 환경을 만들어 창상피복을 도왔다. 창상치유는 환자가 변연절제술 시행 후 지방조직세포를 이식 받은 날을 기준으로 하여 창상이 재상피화되어 샤워 가능한 수준이 될 때를 창상피복이 완료시점으로 정하였다.

III. 결 과

추출된 지방조직 1 mL당 100,000에서 160,000개의 지방조직 세포가 분리되었다. 치료기간은 17일에서 27일 소요되었으며, 편평상피세포암 제거술 받은 환자를 제외하고는 모두 샤워가 가능한 정도로 창상피복이 되었다. 편평상피세포암 제거한 환자의 경우는 노출되었던 골과 건조직이 건강한 육아조직으로 덮여 이식이 가능한 상태로 되었다. 시행한 모든 환자는 감염, 창상재발, 예측하지 못하는 창상의 변화 등 다른 부작용은 없었다(Table I).

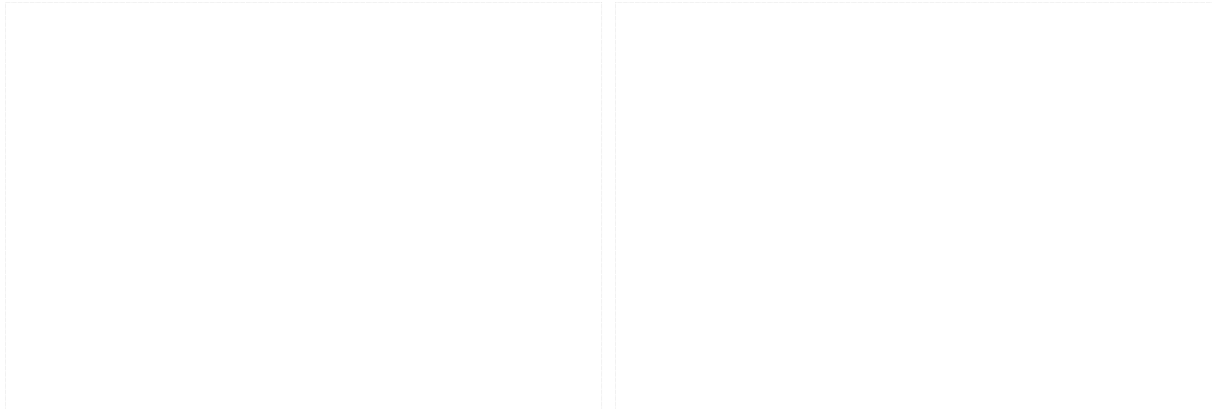


Fig. 2. (Left) Wound was covered with adipose derived stromal cells and fibrin glue. (Right) Tegaderm and medifoam apply dressing.

Table I. Patient Summary

Case	Gender/age	Diagnosis	Site	Wound duration	Time to healing
1	M/65	SCC	Lt. thenar area	0	21 d
2	M/55	Amputation	Rt. thumb	0	27 d
3	F/65	DM foot	Lt. 5th metatarsal area	3 m	17 d
4	F/72	DM foot	Lt. great toe	5 m	26 d
5	M/50	DM foot	Lt. 5th metatarsal area	12 m	21 d
6	M/76	DM foot	Rt. great toe	8 m	25 d
7	M/56	DM foot	Rt. heel	9 m	21 d

M, male; F, female; SCC, squamous cell carcinoma; DM, Diabetic mellitus; Lt., left; Rt., right; m, months; d, days.

증례 1

65세 남자로 색소성 건피증(xeroderma pigmentosum) 기왕력이 있으며, 좌측 무지 부위에 발생한 편평상피세포암으로 암제술 받고 뼈와 건이 노출된 상태이나, 환자의 간 기능 등 전신 상태가 좋지 않아 전신마취가 불가능 하여 지방조직세포이식술을 시도하였다. 세포이식 후 21일이 지나고 육아조직이 노출된 뼈와 건을 덮어 피부 이식이 가능한 상태가 되었다(Fig. 3).

증례 2

남자 55세로 작업 도중 날카로운 기계에 수상하여 우측 엄지손가락의 원위지 약 1/2이 골조직을 포함하여 절단되었으며, 절단된 조직은 손실되어 없었다. 환자의 선택에 따라 족지 조직 전이술은 시행하지 않았으며, 지방조직세포 이식술을 시행 후 27일 후 연부조직 합성 및 재상피화가 관찰되었다(Fig. 4)

증례 3

여자 65세로 3개월 전에 발생한 좌측 제5번째 중족관절부에 생긴 당뇨족으로 내원하였다. 변연절제술 직 후 지방조직 세포 이식술 시행하였으며, 이식 후 17일째 창상 치유가 성공적으로 완료되어 피부와 연부조직 및 노출된 뼈를 비롯한 조직을 덮었

다(Fig. 5).

증례 4

여자 72세 환자로 좌측 엄지발가락에 5개월 전에 생긴 당뇨족으로, 변연절제술 시행 후 지방조직세포이식술 시행하였으며 시행 후 26일이 지나고 궤양 부위가 완전히 닫혔다(Fig. 6).

IV. 고 찰

최근 많은 관심을 받고 있는 지방조직세포는 지방전구세포, 섬유모세포, 혈관내피세포, 중배엽 전구세포 및 줄기세포들이 혼합되어 있다. 특히 지방조직의 줄기세포의 경우 골수줄기세포와 유사하게 중배엽성의 다중계열 분화능력을 보여, 계열 특이 유도 인자를 이용하면 지방세포계열, 골 발생계열, 연골발생계열, 근발생계열로 분화될 수 있다.³ 또한 특정 첨가 인자 없이도 시험관 내에서 쉽게 증식하여 섬유모세포와 비슷한 물질로 되기도 한다.⁴ 하지만 다른 연구에서는 지방 흡입을 통해서 얻은 지방조직세포가 직접 다중계열 분화 능력을 보이는 것이

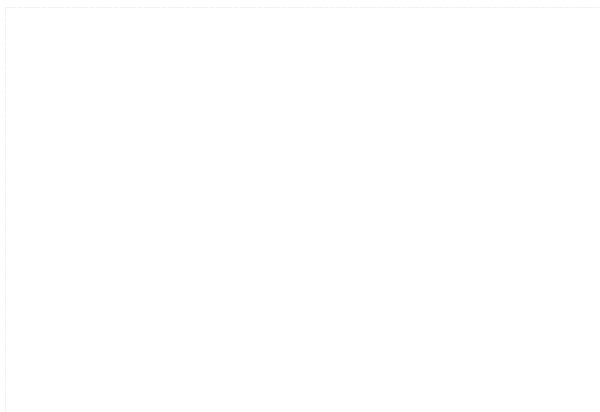
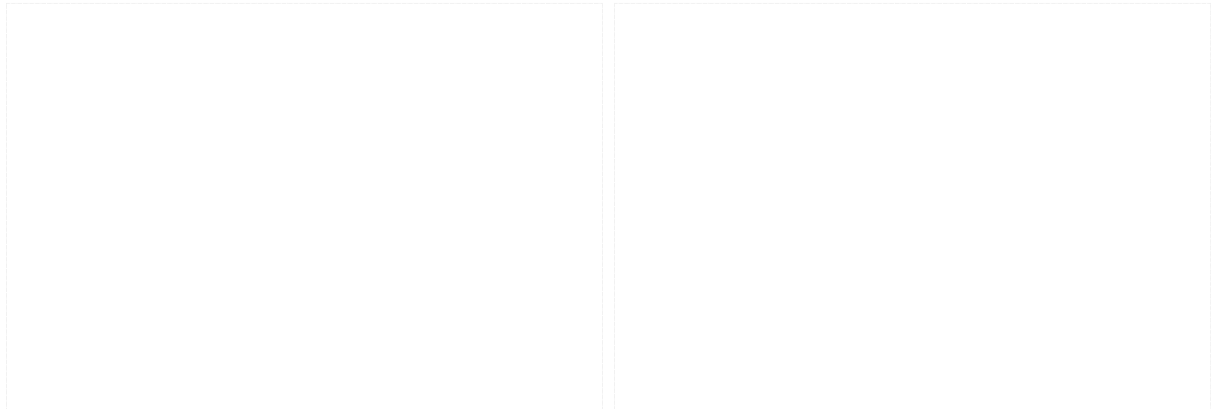


Fig. 3. Case 1. (Above, left) A 65-year-old patient with squamous cell carcinoma on his left thenar area. (Above, right) Immediate postoperative appearance after the cancer resection. (Below) Postoperative appearance on the 21st day after the uncultured adipose derived stromal cells.

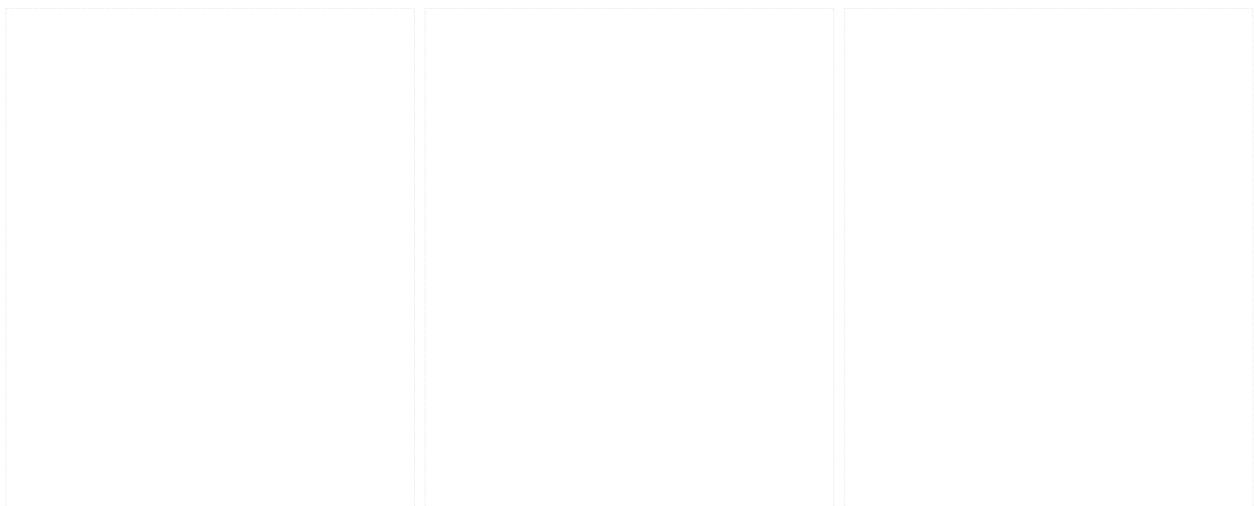


Fig. 4. Case 2. (Left) A 55-year-old patient with an amputated thumb. (Center) Postoperative appearance 10 days after the uncultured adipose derived stromal cells graft. (Right) Postoperative appearance 27 days after the uncultured adipose derived stromal cells graft. The wound was completely closed.

아니라, 지방흡입 과정에서 각 단계의 전구물질이 혈액을 통해서 골수에서 세포가 이동되거나 혹은 지방 흡입 과정의 물리적 힘으로 근육과 뼈와 연골들의 전구물질이 지방 세포와 같이 추출된 것이며 지방조직 세포는 이 과

정에서 각 전구물질의 분화를 돕는 것이라는 주장이 있으며 이를 증명 혹은 반증하지 못하고 있다.⁵

하지만 이번 연구에서 관심을 두는 것은 지방조직세포 하나하나의 다중 계열 분화능력의 유무가 아니라, 지

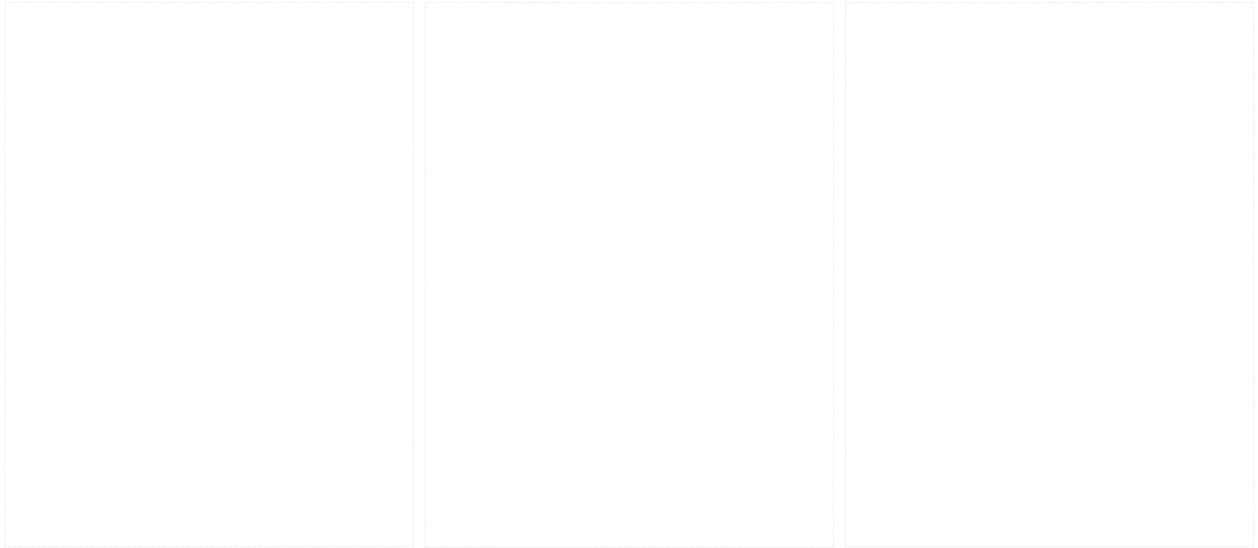


Fig. 5. Case 3. (Left) A 65-year-old patient with DM foot ulcer on her left 5th metatarsal area. Tendon and bone was exposed. (Center) Postoperative appearance 7 days after the uncultured adipose derived stromal cells graft. (Right) Postoperative appearance 17 days after the uncultured adipose derived stromal cells graft. The wound was completely closed.

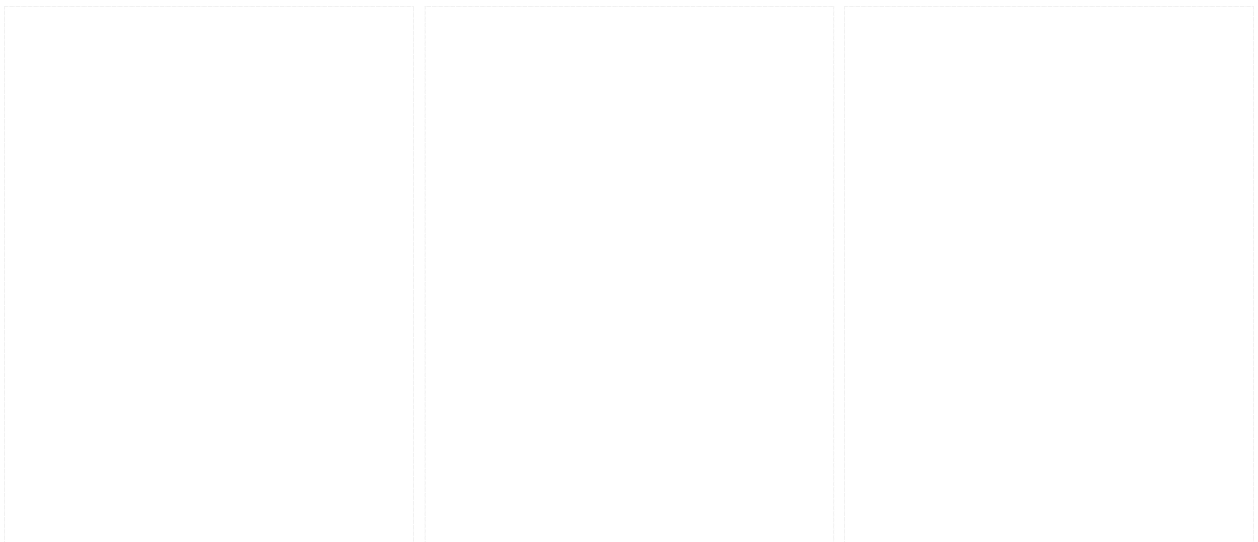


Fig. 6. Case 4. (Left) A 72-year-old patient with DM foot ulcer on her left great toe. (Center) Immediate post-debridement appearance. (Right) Postoperative appearance 26 days after the uncultured adipose derived stromal cells graft.

지방조직세포 전체가 생체에 이식될 때 다중 계열 분화능력과 유사한 능력을 보여 창상 치유에 도움을 주는지에 대한 것이다.

지방조직세포는 섬유모세포와 유사한 형태학적 특징을 지니며 줄기세포와 유사하게 표면 항원인 CD73, CD90, CD105에 양성을 보이며, CD34, CD49d가 관찰되지 않고, 여러 종류의 교원질(collagen), 화이브로넥틴(fibronectin), 그리고 성장인자들을 분비한다.⁶

창상의 치유에는 섬유모세포의 증식이 필수적인데, 지방조직세포는 농도에 의존하여 인간진피 섬유모세포의 증식을 촉진시키며, 일반배양배지보다 지방조직세포를 이식한 배지에서 섬유모세포가 50 - 100% 정도의 더 활발하게 증식되는 것이 관찰되었다.⁷ 또한 인간진피 섬유모세포의 증식을 촉진 하는 능력으로도 인간진피 섬유모세포 보다 지방조직세포의 능력이 30.8%와 67.2%로 지방조직 세포가 우위에 있는 것이 드러났다.⁷

생쥐를 대상으로 하는 생체실험에서 생쥐의 창상에 배양된 지방조직 세포를 이식하고 창상경계를 시간에 따라 현미경 시야 하에 조직병리 관찰을 통해 재생피화되는 과정을 살펴본 결과, 지방조직세포의 치료는 창상의 크기를 감소시켰으며, 창상의 회복 역시 대조군에 비해서 빨랐던 것으로 나타났다. 대부분의 창상은 14일 이내에 회복 되었으며, 수술 후 21일 시행한 조직 병리 검사에서 대조군과 지방조직세포이식군 간의 조직 병리학 적 피부 구조의 차이 및 의미있는 진피층의 염증세포 침윤을 발견하지는 못하였다.⁷ 이는 창상치유 과정에서 배양된 지방조직 세포이식은 비정상적인 창상치유 과정 아닌 정상적인 창상의 치료를 가속화 시킨다는 것을 입증한 것으로 보인다.⁷

이번 연구는 배양하지 않은 지방조직세포를 당뇨족과 급성 창상 환자의 창상 회복에 적용한 임상적 경험에 대한 연구로써, 환자를 대상으로 하는 임상연구의 특성상 대조군 비교 연구를 통해 창상 치유 기간 및 창상 회복의 형태, 회복된 창상의 조직 병리학적 분석 등이 이루어 지지 못했다는 약점이 있다. 또한 배양된 세포와 배양되지 않은 세포에 대한 분석이 없었으며, 이 두 그룹 간의 차이 및 동질성에 대한 비교도 없었다. 따라서 이 치료법의 효과를 입증하고 새로운 치료법으로 자리매김 하기에는 한계가 있으나 이번 예비연구를 통해 배양하지 않은 자가 지방조직세포이식이 실제 임상에서 창상 치유에 상당한 도움이 될 수 있다는 가능성을 제시함으로써 이 방법의 임상적 사용에 교두보가 될 것으로 확신 하며, 향후 후속 연구를 통하여 앞에 언급한 문제점들이 해결되고 좋은 치료법으로 발전하기를 기대한다.

V. 결 론

배양하지 않은 지방조직세포를 창상에 도포하는 방법

은 공여부 희생이 적으며, 상당한 양을 쉽게 얻을 수 있고, 배양을 통한 증식에 필요한 시간절약으로 환자가 필요한 순간 즉각적으로 이용할 수 있으며, 배양에 필요한 특별한 설비와 식약청의 허가가 필요없어 임상적으로 쉽게 사용할 수 있는 세포 치료법으로써 그 효과 역시 만족스러워 그 가능성이 충분히 기대된다 하겠다.

REFERENCES

1. De Ugarte DA, Ashjian PH, Elbarbary A, Hedrick MH: Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plast Surg* 50: 215, 2003
2. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based therapies. *Tissue Eng* 7: 211, 2001
3. Rapisio E, Guida C, Baldelli I, Benvenuto F, Curto M, Paleari L, Filippi F, Fiocca R, Robello G, Santi PL: Characterization and induction of human pre-adipocytes. *Toxicol in Vitro* 21: 330, 2007
4. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ: Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 16: 91, 2007
5. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101, 2003
6. Elabd C, Chiellini C, Massoudi A, Cochet O, Zaragosi LE, Trojani C, Michiels JF, Weiss P, Carle G, Rochet N, Dechesne CA, Ailhaud G, Dani C, Amri EZ: Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 342, 2007
7. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS: Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblast. *J Dermatol Sci* 48: 15, 2007