대한성형외과학회지. 제 37 권, 제 5 호
J Korean Soc Plast Reconstr Surg
Vol. 37, No. 5, 531 - 534, 2010

Phosphatidylcholine과 Sodium Deoxycholate가 지방세포 생존에 미치는 영향의 비교 분석

나은영 · 강조아 · 이중호 · 오득영 · 서제원 · 문석호 · 안상태 · 이종원

가톨릭대학교 의과대학 성형외과학교실

Comparative Analysis about the Effect of Isolated Phosphatidylcholine and Sodium Deoxycholate for the Viability of Adipocyte

Eun Young Rha, M.D., Jo A Kang, M.D., Jung Ho Lee, M.D., Deuk Young Oh, M.D., Je Won Seo, M.D., Suk Ho Moon, M.D., Sang Tae Ahn, M.D., Jong Won Rhie, M.D.

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

Purpose: Lipobean®s, widely used in lipodissolving techniques, contain phosphatidylcholine and sodium deoxycholate as its main substances. They have been approved only as medication for liver disease by the FDA. However, they have been used under various clinical settings without exact knowledge of its action mechanism. The authors designed an *in vitro* study to analyze the effects of different concentrations of phosphatidylcholine and sodium deoxycholate on adipocytes and other types of cells.

Methods: Human adipose-derived stem cell were cultured and induced to differentiate into adipocytes. Fibroblasts extracted from human inferior turbinate tissue, and MC3T3-E1 osteoblast lines were cultured. Phosphatidylcholine solution dissolved with ethanol was applied to the culture medium at differing concentrations (1, 4, 7, 10 mg/mL). The sodium deoxycholate solution dissolved in DMSO applied to the medium at differing concentrations (0.07, 0.1. 0.4. 0.7 mg/mL). Cells were dispersed at a concentration of 5×10^3 cells/well in 24 well plates, and surviving cells were calculated 1 day after the application using a CCK-8 kit.

Results: The number of surviving cells of adipocytes, fibroblasts and osteoblasts decreased as the concentration of sodium deoxycholate increased. However, all types of cells that had been processed in a phosphatidylcholine showed a cell survival rate of over 70% at all concentrations.

Conclusion: This study shows that sodium deoxycholate is the more major factor in destroying adipocytes, and it is also toxic to the other cells. Therefore, we conclude that care must be taken when using Lipobean®s as a method of reducing adipose tissue, for its toxicity may destroy other nontarget cells existing in the subcutaneous tissue layer.

Key Words: Lipobean®, Phosphatidylcholine, Sodium deoxycholate, Adipocytes

Received April 9, 2010
Revised May 10, 2010
Accepted July 22, 2010

Address Correspondence : Jong Won Rhie, M.D., Department of Plastic Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea. Tel: 02) 2258-6142/Fax: 02) 594-7230 /E-mail: rhie@catholic.ac.kr

* 본 논문은 2009년 제 67차 대한성형외과학회 학술대회에서 구연 발표되었음.

I. 서 론

식생활의 서구화로 인해 비만 환자가 급증하고, 지방흡입술에 대한 수요가 늘어나고 있는 가운데 소위 'PPC 주사요법'으로 일컬어지는 지방용해술(lipodissolve technique)이 수술적 치료 없이도 지방층을 파괴시킬 수 있다고 하여 큰 인기를 얻고 있다.

'PPC 주사요법'이란 phosphatidylcholine (PPC)이 포함된 용액을 지방이 국소적으로 축적되어 있는 피하지방층에 주입하여 지방층을 파괴시키는 것으로, PPC와 sodium deoxycholate (DCA)를 주성분으로 하는 제재 (한국의 리포빈®, 독일의 Lipostabil®, 러시아의 Essential®)를 일정 농도로 희석시켜서 사용하는 일종의 mesotheraphy로 알려져 있다.[1]

그러나 이러한 제재들은 본래 고순도의 필수인지질을 공급하고, 중성지방과 콜레스테롤을 현탁시켜 분해, 제거하는 약리적 작용을 하기 때문에 주로 간기능회복에 사용되어 왔으며,[2,3] 현재 식약청의 승인도 정맥주입 경로를 통한 간기능 치료제로써만 받아져 있는 상태이고, 지방 분해 효과는 정확한 약리기전 하에 사용되기 보다는 임상의의 경험에 의존하여 사용되는 경우가 대부분이기 때문에 일관된 프로토콜이 없이 사용되고 있다는 문제가 있다.

또한, 과거에는 이런 제재들이 갖고 있는 구성 성분들 중 PPC가 지방분해를 일으키는 주성분이라 주장하는 연구결과들로 인해 이들을 소위 'PPC 주사'로 불렀으나, 최근에는

PPC보다는 DCA가 주성분이라는 의견[4,5] 또는 각각의 성분이 상호작용을 하여 지방분해가 일어난다는 의견도 많이 제시되고 있기 때문에 리포빈® 사용으로 인한 예기치 않은 합병증을 예방하기 위해서는 리포빈®의 지방용해 작용에 대한 보다 광범위한 연구가 필수적이다.

이에 저자들은 PPC와 DCA의 농도 변화에 따른 지방세포, 조골세포, 섬유모세포의 생존도를 체외(*in vitro*) 환경에서 비교, 분석하여 각 성분이 각각의 세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 세포배양

인체지방조직으로부터 분리, 배양한 지방줄기세포가 80% 이상 포화상태에 이르렀을 때 지방 분화 배지(Stempro; adipogenic differention media)로 교체하여 10일 동안 지방세포로 분화 유도 배양하였다. 또한, 인체 하비갑개 조직으로부터 분리한 섬유모세포와 MC3T3-E1 조골세포주(ATCC; American Type Culture Collection)는 배양 배지(DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% FBS: fetal bovine serum, 1% antibiotic/antimycotic)에서 5% CO_2, 37°C 조건 하에 배양하였다.

나. 시험액 제조 및 처리

PPC 시험액은 에탄올에 용해시켜 50% 농축액을 만들고 각 군의 농도(1, 4, 7, 10 mg/mL)에 맞게 계산하여 배양 배지에 첨가하였으며, DCA시험액은 DCA를 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 10% 농축액을 만든 후 역시 각 군의 농도(0.07, 0.1. 0.4. 0.7 mg/mL)에 맞게 계산하여 배양배지에 첨가하였다.

24-well plate의 각 well에 5×10^3개씩 세포들을 분주하고, 제조한 시험액을 300 μL씩 첨가하여 첨가한 후 다음 날의 생존세포 수를 측량하였다.

또한 용매제에 의한 효과를 보정하기 위해 에탄올과 DCA를 각 시험군에 사용된 양과 같은 양을 첨가한 용매 처리군을 만들었으며 시험액이 첨가되지 않은 배양 배지를 비교군으로 하였다.

다. 생존세포 측량

PPC 및 DCA 시험액이 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 CCK(cell counting kit)-8를 이용해 배양 1일 후에 각 군의 생존세포를 측량하였다. 먼저 CCK-8 용액을 배양 중인 배지 양의 10%에 해당하는 30 μL씩 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 96 well plate에 200 μL씩 옮겨 담아서 scanning multi well spectrophotometer (ELISA reader)를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시험액 처리군의 흡광도를 각 용매 처리군에 대해 보정한 뒤, 배양배지 처리 비교군에 대해 백분율로 환산하여 세포 증식률을 산출하였다.

라. 통계학적 분석

모든 실험 과정은 3회 반복하였고, 실험 수행에 대한 통계학적 분석은 생존세포의 측량에 대해 student's t-test로서 시행하였으며, $p < 0.05$ 시 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

DCA의 농도가 증가 할수록 생존하는 지방세포의 수가 현격히 감소함을 알 수 있었으며, 특히 0.1 mg/mL 이상의 농도군에서는 30% 미만의 세포 생존율을 보일 뿐 아니라 정상적인 모양의 세포를 관찰하기 힘들었다. 섬유모세포와 조골세포의 경우 저농도의 DCA를 첨가한 군에서 이미 세포 생존율이 50% 이하로 감소되어 있었으며, DCA의 농도가 증가할수록 지방세포와 마찬가지로 생존세포의 수가 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

반면 PPC로 처리한 군의 경우, 10 mg/mL의 농도로 처리한 군에서도 모든 종류의 세포가 70% 이상의 생존율을 보였다(Fig. 2).

IV. 고 찰

리포빈®은 1 ample (5 mL)에 주성분인 phospholid 250

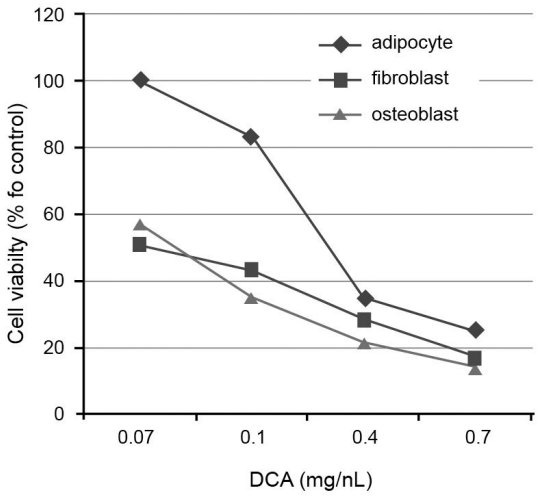

Fig. 1. Cytotoxic effect of deoxychoic acid (DCA) on various cells (adipocytes, fibroblasts, and osteoblasts) assessed by CCK-8 (cell counting kit) assay at 1 day after the media treatment.

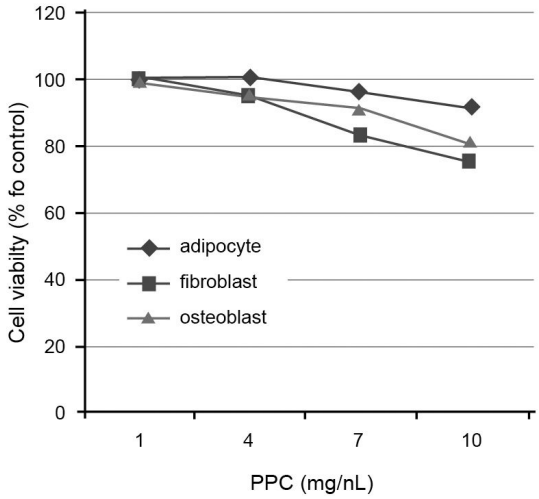

Fig. 2. Cytotoxic effect of phosphatidylcholine (PPC) on various cells (adipocytes, fibroblasts, and osteoblasts) assessed by CCK-8 (cell counting kit) assay at 1 day after the media treatment.

mg과 sodium deoxycholate (DCA) 120 mg 외에도 sodium choloride 18 mg, riboflavin 0.5 mg, ethanol, benzyl alcohol 등 여러 첨가제들이 포함되어 있다. 이들 중 phospholipid는 약 95% 이상이 phosphatidylcholine (PPC) 인데, 이는 난황과 콩에서 추출한 생체막으로 세포막의 균일성을 유지하고 세포막 유동도 (fluidity)의 항상성 조절에 중요한 역할을 하며 세포 신호 전달 (signal transduction)에 의해 지방산을 세포 내외로 수송하는 역할을 한다.[2,6] 또한 이차성 담즙산에 속하는 DCA는 주로 실험실에서 세정제 (detergent)로 쓰이는 물질인데 지질 이중막의 강력한 용매제 역할을 하기 때문에 PPC와 다른 여러 약품을 용해하기 위해 쓰이고 있다.[4]

PPC는 조직에 저장되어 있는 콜레스테롤을 제거하여 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추고 간기능을 보호하는 작용을 갖고 있어 급성 혹은 만성 간염, 간경화, 지방간 등의 간질환 치료제로 쓰이고 있는데[2,4,6] 이런 이유 때문에 PPC가 지방분해를 일으키는 주요 물질이라는 가설들이 제기되어 왔다. Young과 Louis[2]는 PPC가 지닌 양극성의 특징이 세포막 지질 이중층을 미포형태로 변화시켜 지방분해가 일어난다는 가설을 제시하였으며, Hasengschwandtner[6]는 PPC에 의해 리파제 (lipase)가 방출되어 중성 지방이 지방산으로 분해된 후 지단백 (lipoprotein)의 형태로 운반되어 지방분해가 일어난다는 가설을 제시하였다.

그러나 최근 들어 리포빈에서 PPC의 용해 목적으로 쓰이는 DCA의 세정작용을 연구한 여러 체외 실험을 통해 DCA가 지방분해를 일으킨다는 연구결과들이 이어지면서, 리포빈의 지방분해는 DCA가 주된 역할을 하거나 혹은 DCA와 PPC의 상호작용 때문이라는 가설들이 더욱 설득력있게 제기되고 있다.[3-5]

본 실험에서도 지방세포에 PPC, DCA를 각각 농도별로 첨가한 뒤 세포생존에 미치는 영향을 분석한 결과 DCA가 지방세포에 세포독성 (cytotoxic) 작용을 일으키는 주요물질이라는 결론을 얻을 수 있었으며, 리포빈에 의한 지방 분해 작용은 DCA의 세정작용에 의한 지방 용해라는 기존의 가설들을 뒷받침할 수 있었다.

또한, 이러한 DCA의 작용은 지방세포에 특이적인 반응이 아닌 비특이적인 세정 작용에 의한 세포 용해라는 점에 착안하여 섬유모세포와 조골세포와 같은 다른 세포들을 대상으로 동일한 실험을 진행한 결과, PPC는 고농도의 조건에서도 섬유모세포와 조골세포의 생존에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타난 반면, DCA를 첨가한 군에서는 저농도에서도 이미 많은 수의 세포가 사멸했음을 확인할 수 있었다.

물론 본 실험은 체외 실험이고, 리포빈이 임상적으로 적용되는 농도와 체외 실험 농도 간의 괴리가 있을 수 있다는 점에서 섬유모세포와 조골세포에 독성을 미치는 농도값 자체에 임상적 의미가 있다고는 생각하지 않는다. 그러나 리포빈의 작용이 지방세포에 특이적인 반응이 아니라는 점을 임상의들은 항상 염두에 두어야하며, 리포빈을 이용한 지방용해술의 안전성을 검증하고, 불필요한 합병증을 예방하기 위해 본 실험에서 다룬 세포들 뿐 아니라 다양한 종류의 세포들을 대상으로 한 체외 및 체내 (*in vivo*) 실험이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 실험을 통해 저자들은 리포빈의 구성 성분 중 PPC보다는 DCA가 지방세포를 파괴시키는 주요 물질이며, 이는 지방세포 특이적인 반응이라기 보다는 비특이적인 세정 작용에 의한 것이라는 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 실제 임상적으로 적용되는 리포빈 내의 PPC와 DCA의 농도는 본 실험에서 적용한 농도와는 많은 차이가 있고 여러 조건이 배제된 체외 실험과 인체와는 환경이 다르므로 추후 다양한 체내 (*in vivo*) 실험들을 통해 지방 용해술 목적으로 사용되는 리포빈에 대한 적절한 포뮬라 (formula)를 찾아야 할 것으로 생각된다.

또한, 임상의들도 지방세포 외의 세포들에게도 리포빈의 독성이 나타날 수 있음을 염두에 두고, 제재의 사용 시 피하지방층 내에 정확하게 주입함으로써 다른 조직에 대한 리포빈의 영향을 최소화해야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Rittes PG: The lipodissolve technique: clinical experience. *Clin Plast Surg* 36: 215, 2009
2. V. Leroy Young, St. Louis: Lipostabil: The effect of phosphatidylcholine on subcutaneous fat. *Aesth Surg J* 23: 413, 2003
3. Gupta A, Lobocki C, Singh S, Robertson M, Akadiri OA, Malhotra G, Jackson IT: Actions and comparative efficacy of phosphatidylcholine formulation and isolated sodium deoxycholate for different cell types. *Aesthetic Plast Surg* 33: 346, 2009
4. Rotunda AM, Suzuki H, Moy RL, Kolodney MS: Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatol Surg* 30: 1001, 2004
5. Klein SM, Schreml S, Nerlich M, Prantl L: *In vitro* studies investigating the effect of subcutaneous phosphatidylcholine injections in the 3T3-L1 adipocyte model: Lipolysis or Lipid dissolution? *Plast Reconstr Surg* 124: 419, 2009
6. Hasengschwandtner F: Phosphatidylcholine treatment to induce lipolysis. *J Cosmet Dermatol* 4: 308, 2005