

Sphingosine-1-Phosphate (S1P)가 이식지방의 생존에 미치는 영향

윤동주² · 최수종¹ · 최치원¹ · 남수봉¹ · 배용찬¹

부산대학교 의학전문대학원 성형외과학교실¹, 윤동주 성형외과²

The Effect of Sphingosine-1-Phosphate in Survival of Grafted Fat Tissues

Dong Ju Yoon, M.D.², Soo Jong Choi, M.D.¹,
Chi Won Choi, M.D.¹, Su Bong Nam, M.D.¹, Yong Chan Bae, M.D.¹

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, School of Medicine, Pusan National University, Busan; ²Yoon Dong Ju Plastic Surgery Clinic, Busan, Korea

Purpose: Autologous fat grafting is a popular procedure for the correction of the soft tissue depression and deformity. But there are several issues required to be carefully considered in relation to this procedure, mainly about the unpredictability and the low survival rate of the grafted fat due to absorption and partial necrosis. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a lysophospholipid mediator that has been proposed to promote angiogenesis and to regulate the differentiation of adipose derived stromal cells (ASCs). In this study, we analyzed the viability of the grafted fat tissue mixed with S1P into each 12 nude mice (cann.cg-fox1nu/crlori) compared to the group of mice grafted fat tissue only.

Methods: Human aspirated fat was grafted subcutaneously into the backs of 8-week-old nude mice with or without S1P. Eight weeks later, the grafted fat was harvested and the weight and volume were checked. The fat was stained with hematoxylin-eosin and 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Results: S1P group weighed significantly more than the control group ($p=0.009$), and the volume from the S1P group was considerably larger than that of the control group ($p=0.004$) either. In histological features, the surviving layer of the S1P group was thicker than the control group and

microvasculature appeared to be prominent in the S1P group, especially in the outer layers.

Conclusion: These findings suggest that S1P plays a vital role in the soft tissue augmentation, potentially providing a novel point of the control in adipose tissue for microfat graft.

Key Words: Sphingosine-1-phosphate, Fat graft

I. 서 론

연부조직 결손의 교정방법으로는 진피이식, 지방이식, 인공삽입물, 필러 (filler) 등이 사용되고,^{1,2} 이러한 방법들 중에서 최근 많은 연구와 함께 널리 사용되고 있는 것으로 자가지방이식술이 있다.³ 자가지방이식은 인공삽입물에 비해 많은 양을 얻을 수 있으며, 체내 이물반응 등 합병증의 위험이 적은 반면, 채취과정이 다소 복잡하며 이식된 지방의 생존율이 일정하지 않다는 단점이 있다.^{4,5} 이러한 생존율을 높이기 위하여 지방을 덩어리로 또는 미세지방의 형식으로 이식하는 방법이 사용되기도 하며,^{6,7} 지방이식 시 지방기질세포 (adipose-derived stromal cell) 등을 첨가하기도 하였다.⁸

한편, S1P (sphingosine-1-phosphate)는 생체활성 스프링고지질 (sphingolipid)로써, 스프링고신 (sphingosine)이 PDGF (platelet derived growth factor)와 같은 물질의 자극에 의해 인산화되어 생성된다. 이는 지방기질세포를 포함한 수많은 세포의 조절물질로 활용되며 혈관투과성을 조절하고, 지방기질세포의 분화를 유도하며 지방세포 생성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{9,10} 또한, S1P가 혈관내피세포의 분화와 관련된 세포막 수용체의 ligand로 작용하며, 혈관내피세포의 증식과, 튜브 형태의 구조형성 등에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다.¹¹

이에 저자들은 S1P가 자가지방이식의 생존율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대하고, S1P를 첨가한 지방조직을 복합면역반응이 없는 누드마우스 (nude mouse)에 주입하여 그 효과를 알아보려고 하였다.

Received December 18, 2009

Revised April 19, 2010

Accepted April 22, 2010

Address Correspondence: Yong Chan Bae, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, School of Medicine, Pusan National University, 1-10 Ami-dong, Seo-gu, Pusan 602-739, Korea. Tel: (051) 240-7826/Fax: (051) 243-9405/E-mail: baeyc2@hanmail.net

* 본 논문은 2009년 제 67차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 포스터 발표되었음.

II. 재료 및 방법

가. 지방의 채취 (fat sampling)

연구에 필요한 지방조직은 2008년 1월부터 8월까지 지방 이식술을 목적으로 온 환자의 동의를 얻어 흡인된 지방조직 중 미세지방이식술 후 남은 조직을 실험에 사용하였다. 환자의 복부에 절개창을 내어 침윤관 (infiltration cannula) 을 이용하여 tumescent 용액 (2% lidocaine 25.0 mL, 8.4% sodium bicarbonate 2.5 mL, 1:1,000 epinephrine 1 mL, Lactate Ringer's solution 1,000 mL)을 주사하였다. 약 15분간 기다린 뒤, 절개창을 통하여 흡인관 (vacuum cannula)으로 지방조직을 채취하였다.

채취한 지방조직은 콜만 방식의 원심분리기 (Medilite centrifuge, Byron medical, ariz, USA)를 이용하여 3분간 3,000 rpm의 조건에서 원심 분리하였고, 상층의 지질과 하층의 혈액 및 액체 성분을 제거하고 남은 지방조직층을 얻어 실험에 사용하였다.

나. 누드마우스 모델

실험은 이중 지방이식 시 거부반응을 줄이기 위하여 생후 8주의 누드마우스 (cann.cg-fox1nu/crlori) 12마리를 사용하였다. S1P (BIOMOL, USA)는 시약을 65°C로 가열한 메탄올에 녹여 농축액을 만들었고, PBS (phosphate buffered saline)용액을 이용하여 실험에 사용하는 농도로 희석하여 사용하였다. 5 mg/mL Pentobarbital을 이용하여 복강마취를 시행한 누드마우스의 배부 (背部)를 소독한 뒤, 주입할 부위에서 꼬리쪽으로 2 cm 떨어진 곳에 18 G 바늘로 작은 절개창을 내고 콜만식 주입관을 피하층으로 삽입하여 좌측 실험군에서는 40 µL의 10 µM S1P를 0.4 mL 지방에 섞어 5

분간 반응시킨 후 이식하였고, 우측 대조군에서는 0.4 mL의 순수 미세지방만을 이식하였다. 실험관찰기간 동안 누드마우스 개체간의 마찰로 인한 영향을 없애기 위해 누드마우스는 한 마리씩 분리하여 사육하였다.

다. 이식된 지방의 평가

지방이식 8주 후에 누드마우스의 배부를 절개하여 이식된 지방조직을 채취하였다 (Fig. 1).

1) 이식된 지방 무게의 측정

12마리의 누드마우스에서 좌측 실험군과 우측 대조군의 채취된 지방조직 무게를 Electronic Balance (AEX-200G Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다.

2) 지방의 부피의 측정

부피측정이 어려웠던 2마리를 제외한 10마리의 누드마우스에서 좌측 실험군과 우측 대조군에서 채취된 지방조직의 부피를 측정하였다. 실린더에 채취된 지방조직을 넣고, 생리식염수 1 mL가 채워진 주사기로 실린더에 생리식염수를 1 mL 높이가 될 때까지 채운다. 이때 주사기에 남은 생리식염수의 양을 지방조직의 부피로 계측하였다 (Fig. 2).

대조군과 실험군 간의 무게와 부피차이에 대한 평균과 표준편차를 구하였고, 유의성을 검증하기 위해 paired T-test를 사용하여 *p*가 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다.

3) 조직학적 소견

a. 광학현미경학적 소견

대조군과 실험군의 지방조직을 채취한 후, 4% 포르름 알데

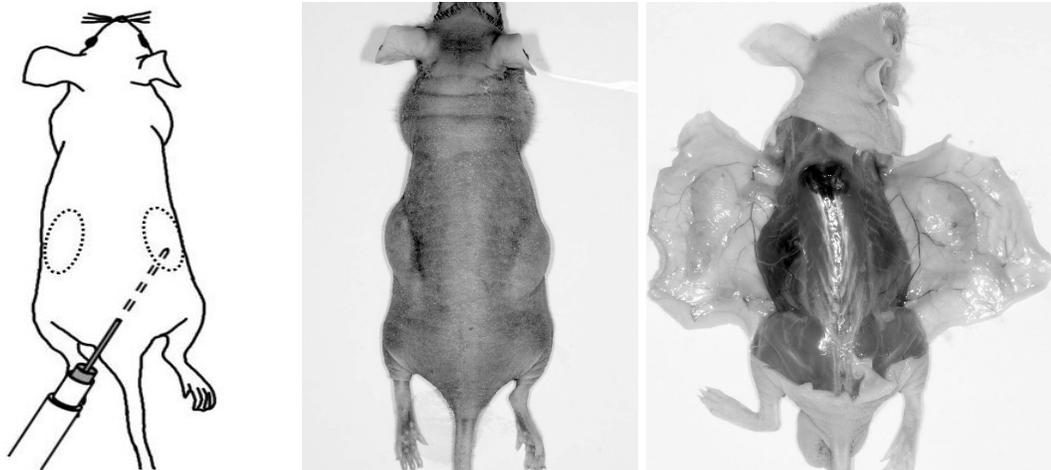


Fig. 1. (Left) Schematic description of injection of fat tissue in nude mice. (Center) Photographs of S1P group (left) and the control group (right) in nude mice. (Right) Grafted fat was harvested in 8 weeks.

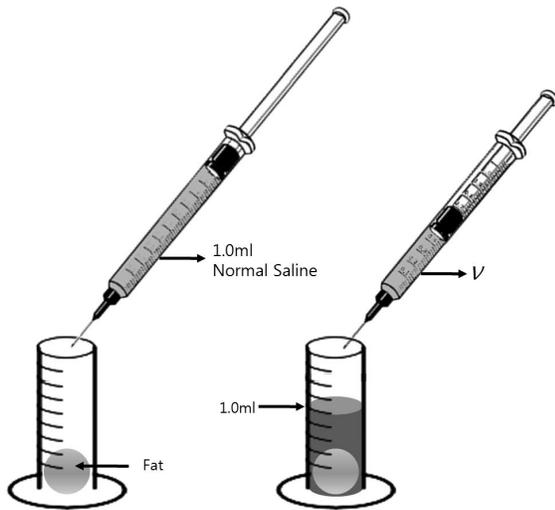


Fig. 2. The estimation of volume of grafted fat in both groups in 8 weeks. V, fat volume.

하이드로 하루 동안 고정 뒤, 파라핀 포매 후 탈파라핀화 한 조직절편을 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 하에서 조직의 모양을 분석하였다.

b. 형광현미경학적 소견

파라핀 조직절편이 붙어있는 슬라이드를 60°C에서 35분 동안 두어 파라핀을 녹여낸 후, 크실렌(xylene)에 5분 동안 담가 두기를 3회 반복하였다. 에탄올 100%부터 50%까지 10%간격으로 2분마다 차례대로 담가 두었고, Rocker (N-BIOTEC, INC., NB-104, Korea)를 이용하여 PBS로 5분 동안 3회 반복하여 세척하였다.

항체를 처리하기 전에 조직절편이 붙어있는 슬라이드를 10 mm 구연산나트륨(sodium citrate)용액에 담가 전자레인지에 이용하여 10분간 열처리하였다. 즉시 차가운 얼음물에 옮겨 충분히 식힌 후, PBS로 5분간 세척하였다.

DAKO pen을 사용하여 조직절편 주위로 테두리를 그린 후, 5% BSA (bovine serum albumin)에 1시간 동안 담가 두었다. 1차 항체 vWF (von Willebrand factor, ab11713, abcam, UK)를 1% BSA와 0.025% Tween-100 (AMRESCO, USA)이 포함된 PBS용액과 1:1,000의 비율로 희석하여 4°C 하에서 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 10분씩 세 차례 세척하였고, 2차 항체 (anti-Alexa fluor rabbit 488, A11094, Invitrogen, USA)를 1% BSA와 0.025% Tween-100이 포함된 PBS용액과 1:2,000의 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 10분씩 3회 반복하여 세척하였고, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 용액을 1방울 떨어뜨린 후 슬라이드 커버글라스를 기포가 생기지 않도록 조심하여 덮었다. 형광현미경을 사용하여 자외선 하에서 DAPI

로 염색된 전체 세포의 핵을 관찰하였고, 녹색 형광 파장을 보여주는 렌즈를 선택하여 vWF의 염색을 관찰하였다.

본 연구에서 포함된 동물실험계획서는 본교 동물실험윤리위원회 (PNU-IACUC)에 의해 동물실험의 윤리성과 과학성에 대한 검토를 받아 적합한 것으로 승인 (승인번호: PNU-2009-0065)을 획득하여 수행되었습니다.

III. 결 과

가. 이식된 지방의 무게와 부피

1) 이식된 지방의 무게

12마리의 누드마우스에서 얻어진 실험군과 대조군의 지방조직의 평균 무게 및 표준편차는 실험군에서 $0.243 \pm 0.041g$ (60.8%), 대조군에서 $0.218 \pm 0.032g$ (54.5%)의 결과를 나타내었으며, 유의확률 p 는 0.009로, S1P가 첨가된 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 무거운 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

2) 이식된 지방의 부피

10마리의 누드마우스에서 얻어진 실험군과 대조군의 지방조직의 평균 부피 및 표준편차는 실험군에서 $0.267 \pm 0.051 mL$ (66.8%), 대조군에서 $0.234 \pm 0.040 mL$ (58.5%)의 결과를 나타내었으며, 유의확률 p 는 0.004로, 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 부피가 큰 것으로 확인되었다 (Fig. 4).

나. 조직학적 소견

1) 광학현미경학적 소견

S1P를 처리한 실험군에서는 지방세포 전체를 둘러싸고 있는 생존층 (surviving layer)이 두껍고 미세혈관구조

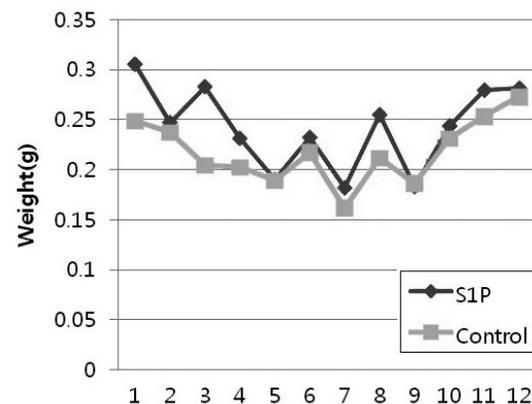


Fig. 3. Weight of grafted fat in control group and S1P group at 8 weeks. S1P group weighed significantly more than control group ($p=0.009$).

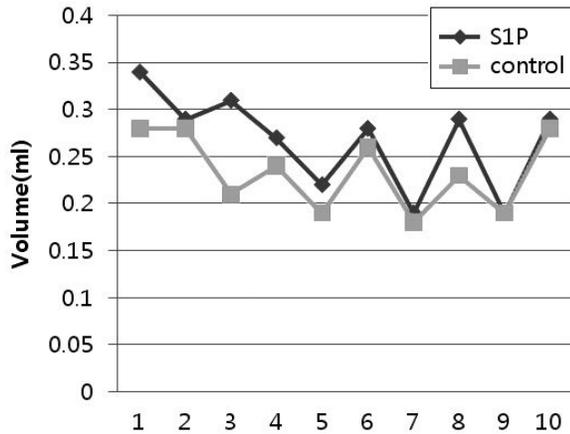


Fig. 4. Volume of grafted fat in control group and S1P group at 8 weeks. S1P group volume was significantly larger than that of control group ($p=0.004$).

(microvasculature)가 더 발달되어 있는 것에 비해, 대조군에서는 중심성 괴사(central necrosis)를 대부분에서 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 지방세포의 형태에 있어서는 대부분 둥근 타원형태를 밀도 있게 유지하고 있는 실험군에 비해, 대조군은 세포형태가 변형되어 세포막표면이 거칠거나 찌그러져 있음을 관찰할 수 있었다.

2) 형광현미경학적 소견

조직소견 상 DAPI로 염색되어 푸른빛을 띠는 세포의 핵을 통해 대조군과 실험군 각각에 대한 세포의 위치와 분포 정도를 확인하였고, 혈관형성관련 세포를 인식하는 vWF에 대한 녹색 반점 (green spot)의 분포 정도를 볼 때, 대조군보다 실험군에서 좀 더 밀도 있게 형성되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 미세혈관 구조는 이식된 지방의 중앙부분보다는 바깥층 쪽으로 더 많이 분포하고 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6).

IV. 고 찰

1800년대 말 Neuber가 처음으로 상완부에서 안와로의 성공적인 지방이식술을 시행한 이후, 최근 콜만방식에 의한 미세지방이식술에 이르기까지 지방이식술은 여러 가지 장점으로 성형외과 영역에서 아주 널리 쓰이고 있는 술식 중의 하나가 되었다.^{3,12}

자가지방은 많은 장점을 가진 반면, 지방을 채취, 정제, 이식하는 과정에 따라 이식 후 생존율이 일정하지 않다는 단점을 나타내고 있으며,^{3,4} 이러한 단점을 보완하기 위해 기구 및 술기 등에 대해 많은 연구가 되고 있으며, 지방을 덩어리로 또는 미세지방이식의 방법으로 생존율을 높이고

일정하게 유지하려는 노력이 행해지고 있다.^{10,12}

또한 혈관내피세포의 분화를 유도하고 신생혈관의 생성을 유도하는 것으로 알려진 지방기질세포를 면역이 결핍된 마우스에서 미세지방이식 시에 첨가하여 연부조직의 증대에 효과가 있다는 것을 사실이 보고되었다.⁸

저자들은 이러한 효과를 가진 지방기질세포에서 평활근 세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려진 SIP에 대해 관심을 가지게 되었다.

SIP는 지질의 중심 구조물인 스핑고신의 인산화물로서, SIP는 증식, 생존, 이동, 세포항상성의 조절, 증식반응 등과 같은 기본적인 세포반응을 조절하며,¹³ 다양한 지방기질세포의 줄기세포성 (stemness)를 유지할 뿐만 아니라 세포분화를 유도하는 다양한 기능의 조절 인자로 알려져 있다.⁹ 또한, SIP의 주요한 세포생리학적 기능은 혈관내피세포 (vascular endothelial cells), 골격근 아세포 (skeletal myoblast), 파골세포 (osteoclast) 등의 분화에 현저한 영향을 미친다.^{14,15}

Lee 등¹¹은 사람의 제대정맥 내피세포에서 SIP가 혈관신생에 있어서 매우 중요한 혈관내피세포의 증식과 이동, 혈관의 구조형성 등의 모든 과정에 중요한 역할을 한다는 것을 보고 하였으며, Hashimoto 등¹³은 마우스의 3T3-L1 세포에서 sphingosine kinase (SphK)의 유도도 SIP가 증가되어 지방세포생성 (adipogenesis)이 일어나고, 이는 기존의 혈관에서 신생혈관형성 (angiogenesis)과 지방세포생성을 유도한다는 것을 보고하였다.

이에 저자는 연부조직의 보충 방법으로 사용되는 지방이식술 시, 이식지방의 생존율을 증가시킬 수 있는 한 방법으로 이식지방에 SIP를 첨가하는 실험을 시행하였다. 누드마우스에 미세지방과 함께 SIP를 이식한 실험군과 미세지방만 이식한 대조군을 비교해 볼 때, 지방의 무게와 부피에 있어서 통계학적으로 유의하게 증가를 보였으며, 광학현미경과 형광현미경학적 소견에서도 미세신생혈관생성뿐만 아니라, 대조군에서 나타난 중심성 괴사가 없이 지방조직의 생존을 나타냄을 확인할 수 있었다.

이는 SIP가 미세지방이식 시에 존재하는 지방기질세포의 분화를 촉진하고 이와 더불어 미세신생혈관 생성에도 영향을 주어 지방조직의 흡수율을 감소시키고 생존율을 증가시켜 지방 증식에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

이 실험은 인체가 아닌 누드마우스에서 시행되었고, 실험 후 무게와 부피 측정의 용이성을 위해 실제 미세지방 이식과는 다르게 하나의 덩어리로 지방을 이식하였기에 그 결과의 분석에서 어느 정도의 한계가 있을 것으로 생각된다.

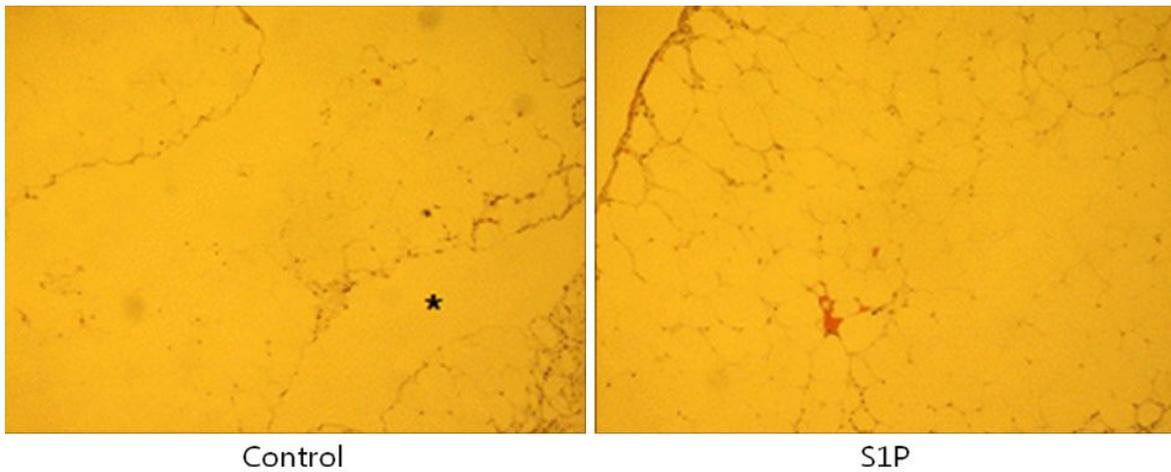


Fig. 5. Histologic features of control group and S1P group (H-E, $\times 200$). Central necrosis (★) was almost always seen in control group. The surviving layer of S1P group was thicker than control group. Microvasculature was more frequently seen in S1P group.

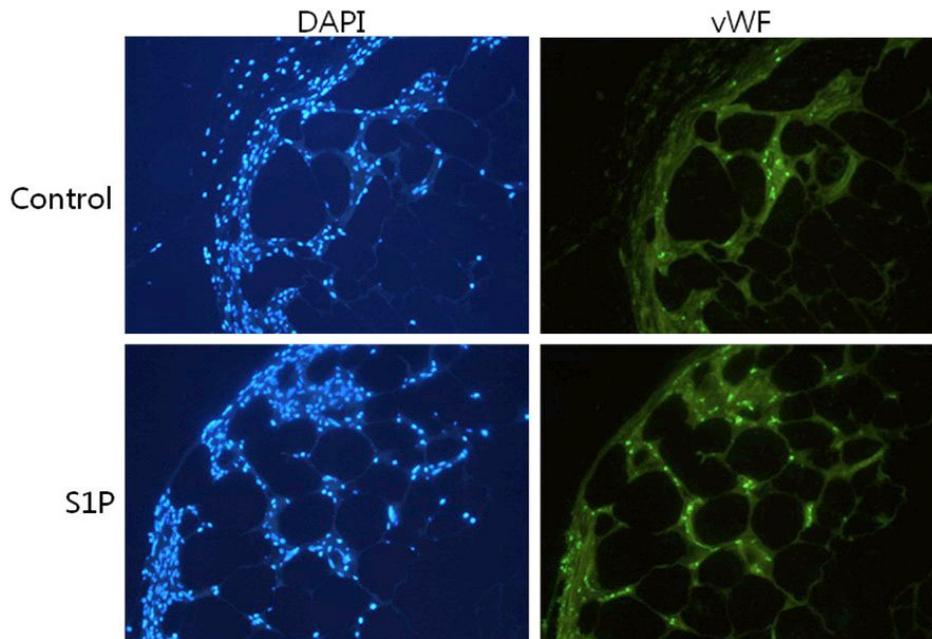


Fig. 6. Immunohistology of control group and S1P group. Endothelial cells were immunostained with vWF. Nuclei were stained with DAPI. Microvasculature was appeared to be prominent in S1P group, especially in the outer layers, but not in control group.

V. 결 론

혈관투과성의 증가 등의 기능을 가진 S1P가 지방이식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 인체에서 흡인한 지방을 대조군과 S1P를 첨가한 실험군으로 나누어 12마리의 누드마우스의 배부 양측에 각각 이식하고 8주 후에 그 무게와 부피를 각각 측정하고 조직학적 소견을 관찰하였다.

남아있는 실험군 지방의 무게 (0.243 ± 0.041 g)와 부피 (0.267 ± 0.051 mL)는 대조군의 무게 (0.218 ± 0.032 g)와 부피 (0.234 ± 0.040 mL)에 비해 유의한 차이를 보였고, 조직학적으로도 중심성 괴사를 보인 대조군과는 달리 두터운 바깥층과 더 많은 미세혈관생성의 소견을 확인할 수 있었다.

따라서 미세지방이식 시에 S1P는 지방의 흡수를 줄이고

생존을 높이는 효과가 있는 것으로 사료되어 보고하는 바이다.

REFERENCES

1. Fenske NA, Lober CW: Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol* 15: 571, 1986
2. 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
3. Colmeman SR: Structural fat grafts: The ideal filler? *Clin Plast Surg* 28: 111, 2001
4. Carraway JH, Mellow CG: Syringe aspiration and fat concentration: a simple technique for autologous fat injection. *Ann Plast Surg* 24: 293, 1990
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. Ersek RA, Chang P, Salisbury MA: Lipo layering of autologous fat: an improved technique with promising results. *Plast Reconstr Surg* 101: 820, 1998
7. Shiffman MA, Mirrafati S: Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg* 27: 819, 2001
8. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, Aiba Kojima E, Iizuka F, Inoue K, Suga H, Yoshimura K: Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 12: 3375, 2006
9. Nincheri P, Luciani P, Squecco R, Donati C, Bernacchioni C, Borgognoni L, Luciani G, Benvenuti S, Francini F, Bruni P: Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 66: 1741, 2009
10. Kim YK, Park HS, Lee HJ: Studies on the proper storage period and change of -20°C cryopreserved adipocyte. *J Korean Soc Aesth Plast Surg* 12: 33, 2006
11. Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG: Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 743, 1999
12. Jang KM, Kim JY, Yang JD, Chung HY, Park JW, Cho BC: Proper condition of centrifugation for the fat cell viability in the autologous fat injection. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 33: 423, 2006
13. Hashimoto T, Igarashi J, Kosaka H: Sphingosine kinase is induced in mouse 3T3-L1 cells and promotes adipogenesis. *J Lipid Res* 50: 602, 2009
14. Hla T, Maciag T: An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 265: 9308, 1990
15. Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH: Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J* 25: 5840, 2006