

영하 20°C 냉동보관된 지방세포의 변화 및 적절한 보관 기간에 대한 고찰

김유경¹, 박흥식², 이현자³

룩성형외과¹, 에뜨성형외과², 국립한경대학교 영양조리학과³

The use of autologous fat grafts has questionable clinical value due to unreliable grafts survival. For the purpose of improved graft survival, re-implantation of cryopreserved adipocytes is developed. The purpose of study is to analyze the changes of freeze-preserved adipocytes and to find out efficient long-term storage period. After centrifugation of aspirated abdominal tissues, 10 ml of packed adipocytes were frozen at -20°C (n=70). For 6 months, each 10 frozen samples were taken and analyzed at 1 month interval. Significant volume changes were observed in cryopreservation for 3 months ($p < 0.05$). The profiles of total lipid and FFA were not changed and no significant difference in saturated fatty acid ratio with gas chromatography. No histologic changes were observed, independent of the freezing period with H & E stain. The reduction of mitochondrial enzymatic activity was observed independent of time interval but activity of mitochondrial dehydrogenase was reduced less than 50% in XTT assay. On the basis of these data, -20°C freezing for 6 months has no adverse effect to adipocytes, but fragile adipocytes, damaged cell membrane during harvest procedure, were disrupted within 1 month and the maximum volume reduction were followed less than 3 months. These results demonstrate that tissue preparation cells with no cell membrane damage have the greatest viability level and cryopreservation less than 3 months has great volume effect.

Key Words: Fat graft, Cryopreservation, -20°C freezing, Adipocyte damage, Graft survival

Studies on the Proper Storage Period and Change of -20°C Cryopreserved Adipocyte

Yoo Kyung Kim, M.D.¹,
Heung Sik Park, M.D.², Hyun Ja Lee, Ph.D.³

¹Look Plastic Surgical Clinic, ²At Aesthetic Plastic Clinic, ³Department of Nutrition & Culinary Science, Hankyung National University

Address Correspondence: Yoo Kyung Kim, M.D., Look Plastic Surgical Clinic, Seoul Sangho Savings Bank 4/F 514-2, Sinsa-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-120, Korea. Tel: (02) 3445-5100, Fax: (02) 515-3877, E-mail: kykps@chol.com

* 본 논문의 실험은 국립한경대학교 식품생명공학과 실험실 및 T & C 병리과의원의 협조로 이루어짐.

* 본 논문의 병리검사 및 판독을 도와주신 T & C 병리과 김호정 선생님과 미토콘드리아 활성도 측정에 도움을 주신 식품생명공학과 손종연 교수님께 감사드립니다.

1. 서론

최근에 성형외과 영역에서 자가지방이식술(auto-logous fat graft)을 임상에 많이 사용하고 있다. 자가지방은 쉽게 채취가 가능하고, 상대적으로 저렴하며, 체내 이물반응 등 합병증의 위험이 적은 안전한 보형물로 인식되고 있으나, 자가지방이식의 조건에 따라 흡수율 차이가 많아 그 결과를 예측할 수 없는 단점이 있다. 따라서 지방세포의 생착률을 최대 높이기 위한 지방세포의 채취, 분리 및 재주입 과정에 대해 많은 연구가 진행되어 왔으며, 최근에는 채취된 자가지방의 일부를 냉동보관한

후 일정시간이 지난 뒤 흡수된 만큼 이식부위에 재주입하는 방법이 시도되고 있다. 이에, 냉동보관된 자가지방의 재주입 시 생착률을 높이기 위한 냉동지방의 변화에 대한 연구가 중요한 문제로 대두되고 있다.¹⁻⁵

지방세포(adipocyte)는 영하 20°C에서 7일간 냉동보관 시 지방세포의 미토콘드리아 활성(mitochondrial activity)이 유지되며, 냉동 전 상태와 비교 시 지방세포의 파괴 및 변화가 미미하다고 보고된 바 있으나,⁴ 실제 임상에서 냉동지방의 이용 가능한 시기는 이식된 지방의 완전한 생착이 이뤄지는 시기인 이식 후 1개월 경과 후이므로,³ 1개월 이상 장기간 냉동보관된 지방세포의 변화 및 효과적인 보존기간에 대한 연구가 필요한 현실이

다. 일반적으로 세포를 냉동보관 시 직접적인 세포손상(direct freezing injury)의 결과로, 세포형태의 변화가 일어나고, 미토콘드리아 활성이 감소되며, 세포막의 파괴로 세포내 구성물의 외부 유출과 함께 세포막을 구성하고 있는 지질성분의 변성 및 조성의 변화가 일어난다.⁶⁻⁸ 특히 지방세포는 세포 내 성분의 대부분이 지질로 구성되어 있으므로, 지방세포가 냉동으로 인한 세포손상을 받게 되는 경우, 세포막 지질성분의 변성 외에도, 세포내 성분인 지질이 외부로 유출되며 지질류의 대사가 일어나고 지방산(fatty acid)의 변화가 일어난다.^{7,8} 이에, 1개월 이상 영하 20°C 냉동보관된 지방세포의 육안적 부피변화, 세포형태의 변형 정도, 미토콘드리아 활성 변화, 지방세포가 파괴될 때 나오는 부산물인 지질의 성분 분석 및 조성 변화를 관찰함으로써 지방세포에 미치는 냉동보관의 안전성 여부를 알아보고, 냉동보관된 지방세포의 효과적인 보관시기를 결정하여 임상에 응용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

가. 실험 대상 준비(Sample preparation)

2004년 7월부터 12월까지 지방이식술을 목적으로 본원(특성형외과)을 내원한 환자들 중 21 - 45세의 여성 70명을 대상으로 하였다. 투메스نت 마취(Tumescent anesthesia) 후 3 mm coleman 흡입관(Coleman cannula, Byron medical, Tuscan, Ariz)과 10 cc 주사기를 이용하여 저압 주사기흡입술(syringe aspiration)을 하여 복부 지방조직을 흡입 채취하였다. 흡입된 지방조직을 3600 rpm에서 1분간 원심분리(centrifuge)하여, 상층의 지질(oil)과 파괴된 세포 파편들(cell debris), 중간층의 지방세포가 다량 함유된 조직 층(지방세포 층), 하층의 혈액 성분으로 분리하였다. 상층과 하층 부분을 제거하고 남은 지방세포 층을 얻은 후, 시료 양을 각각 10 cc로 수집한 후, 지방세포의 가장 효과적인 보관 온도로 알려진 영하 20°C 냉동고(Operon, iso 9001, Korea)에 냉동보관하였다. 채취 직후의 지방조직을 대조군으로 하였다. 대조군의 처리과정은 원심분리 후 분리 수집된 샘플 10 cc를 다시 3600 rpm으로 1분간 원심분리 하였는데, 이는 채취 당시 취약한 지방세포가 외부 압력에 의해 단순 파괴된 결과로 간주하였다(0군, n=10). 냉동보관 1개월 경과 후 보관된 시료를 꺼내어 실온에서 자연해동 후 3600 rpm에서 1분간 원심분리 한 후 육안적 부피 변화

를 관찰하였으며, 중간 지방세포층의 지방세포들을 각각 2 cc씩 취하여 지방세포의 형태 분석 및 미토콘드리아 활성 측정에 이용하였다. 상층 지질층을 수집하여 지방질 함량 분석과 지방산 조성 분석을 하였다(1군, n=10). 냉동 2 - 6개월의 시료들도 마찬가지로 실험하였다(2 - 6군, n=10).

나. 실험방법

1) 감소된 지방세포 부피 측정

원심분리 후, 분리된 상층 지질층을 제외한 지방세포층의 부피를 측정된 후, 냉동 전 상태의 대조군과 비교하여 감소한 지방세포의 비율의 평균과 표준편차를 구하였다. 연구결과의 통계학적 분석은 Kruskal-Wallis test(SPSS version 11.0)를 이용하였고, 95% 신뢰도 구간에서 $p < 0.05$ 인 경우를 의미있는 결과로 보았다.

2) 총지방질 함량 분석

생체지질의 총지방질 함량은 Folch 등의 방법에 따라 행하였다.⁷ 즉, 분석 시료를 비이커에 1 g정도 취하여 메탄올(methanol) 10 cc를 가하고 1분간 균질화(homogenization)한 후 클로로포름(chloroform) 20 cc를 가해 2분간 균질화하였다. 이 혼합물을 여과하고 남은 잔사에 클로로포름과 메탄올을 2:1로 혼합한 혼합 용액 30 cc를 가해 3분간 균질화하고, 여과한 후 고체 잔사는 다시 클로로포름 20 cc와 메탄올 10 cc를 가해 세척(washing)하였다. 모인 여과액을 비이커에 옮겨 여과액의 1/4만큼 0.88% 염화칼륨(KCl)을 가해 반응시킨 후, 상층액은 버리고 하층액의 1/4만큼 취해 증류수와 메탄올의 1:1 혼합 용액을 가해 하층을 분리하였다. 분리된 하층을 미리 함량을 구해놓은 수기에 넣어 감압 농축하여 건조한 후 수기의 함량을 구하였다.

$$\% \text{ Fat/Oil} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100$$

W₁: 시료의 무게

W₂: 감압농축수기의 함량

W₃: 실험 후 감압농축수기의 함량

3) 지방산 조성의 분석

생체지질의 지방산 조성은 AOCS방법 Ce-2-66⁹에 따라 메틸에스테르(methyl ester)화하여 gas liquid chromatography에 의해 분석하였다. 즉, 시료를 50 cc 반응

플라스크에 1 g 정도 취한 다음 0.5 N NaOH/methanol 을 4 cc 가한 후 환류, 냉각하면서 10분간 가열하였다. 다음으로 14% BF₃/methanol 5 cc를 가하고 2분간 반응 시킨 다음 hexane 5 cc를 가하고 1분간 가열하였다. 반응 후 삼각 플라스크를 분리 냉각시키고, 이를 시험관에 옮겨 염화나트륨 포화 수용액을 가하고 상층의 hexane 층을 분취하여 분석 시료로 하였다. 이때 사용한 장치와 조작 조건은 Table I과 같았으며, 이들 분석 지방산의 체류시간(retention time)은 Fig. 1과 같았다.

4) 지방세포의 형태학적 분석

각 군의 지방세포를 2 cc씩 수집하여 세포원심분리(cyocentrifuge)와 세포군집 절편(cell block) 후 Hema-toxylin and Eosin 염색하여 200배 광학현미경으로 전체 지방세포들에 대한 정상적인 지방세포와 비전형적인 지방세포의 비율을 측정하였다. 이때 정상 지방세포의 형태적 판단 기준은 다음과 같다. 정상 복부 지방세포는 채취부위에 따라 세포 크기가 다양하나 비교적 둥근 형태를 유지한다. 전체적인 세포들의 배열은 불규칙적이며, 군데군데 loose collagen이 일부 관찰되기도 한다.¹⁰

5) 지방세포의 미토콘드리아 활성 측정

지방세포의 미토콘드리아 활성 측정은 XTT-tetrazolium assay([2,3-bis-5-carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) 방법으로 시행하였다. 즉, 각 군의 지방세포 1 cc씩을 비이커에 취한 후 15,000 rpm에서 1분간 원심분리(Hitachi-CR 21, Japan)하여 균질화시킨 후 시료로 사용하였다. 준비된 시료 0.2 cc씩 24 well plate에 나누어 담은 후, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지 0.5 cc를 가하였다. 상품화된 XTT reagent kit(Cell proliferation kit, Biological industries, Israel)를 이용하여, XTT 시약(reagent) 15.0 mL와 전자 결합 시약(electron coupling reagent) 0.3 mL을 혼합한 후 혼합액을 1.5 cc씩 각각의 well에 나누어 가한 후, 37도 항온 수조(water bath)에 3시간 동안 부화(incubation)시킨 후 반응시켰다. 반응액을 16,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 492 nm 분광광도계(spectrophotometer, Tu-1800, Korea)로 흡광도(OD, optical density)를 측정하였다. 이때 OD 측정의 대조군으로 지방세포를 넣지 않은 반응액만을 가지고 OD를 측정하였으며, 각각의 시료의 오차를 줄이기 위해 음성대조군(negative control)으로 각 군의 지방세포 1 cc씩 추가로 취하

여 70도 항온기에서 10분간 가열한 후, 같은 방법으로 XTT 반응 후 OD를 측정하였다.

III. 결 과

가. 감소된 지방세포 비율 측정

냉동기간에 따른 지방세포의 부피 변화는 0군(대조

군)의 경우 감소된 지방세포의 부피는 0.3%였고, 영하 20°C 냉동 1 - 6개월에 걸쳐 지방세포의 부피 감소는 각각 0.82%, 3.07%, 12.83%, 15.06%, 15.67%, 16.15%로서 (Table II, Fig. 2), 대조군과 비교시 냉동 3개월 이후에서 유의있는 부피 차이를 보였다(Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). 냉동기간 별로는 2개월까지 부피 감소의 차이는 없었으나, 2개월에서 3개월로 변화할 때 유의있는 부피 감소가 관찰되었다. 냉동 3개월 이후에는 냉동기간에 따른 추가적인 지방세포의 감소는 관찰되지 않았다(Table III).

나. 총지방질 함량 및 지방산 분석

취약한 지방세포가 단순 파괴된 부산물(0군)의 총지방질 함량은 89.44%였으며, 생체지방질 중에는 myristic acid(C14:0), palmitic acid(C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1) 및 linoleic acid (C18:2)의 6개의 지방산이 검출되었으며, 이들의 함량은 각각 2.7%, 24.9%, 4.8%, 4.6%, 42.1% 및 20.9%이었다 (Table IV). 한편 생체 지방질의 포화 지방산(saturated fatty acid), 단가불포화 지방산(monounsaturated fatty acid) 및 다가불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid)의 함량은 각각 32.2%, 46.9% 및 20.9%이고, 포화지방산에 대한 다가불포화 지방산의 비(P/S)는 0.65였다(Table V). 실험군들의 경우, 냉동기간에 따른 총지방질 함량, 생체 지방질의 조성, 함량 및 P/S의 비율은 전 군에서 대조군과 유사한 결과를 보였다(Table IV, V, Fig. 3, 4).

다. 지방세포형태학적 분석

대조군(0군)의 경우 투메스트 마취의 영향으로 팽윤된 형상을 보이기는 하나 대부분 세포막의 파괴없이 둥근 형태를 유지하고 있었으며, 세포막이 파괴되어 깨어진 세포들(ruptured cell) 및 원추형으로 신장된 비전형적인(atypical) 지방세포들은 20% 정도의 비율로 관찰되었다(Fig. 5).

냉동기간별 비전형적인 지방세포는 냉동 2개월의 경우 40%, 냉동 4개월의 경우 30% 비율로 증가한 소견을 보였다. 그러나, 냉동 1, 3, 5, 6개월의 경우 20% 비율로 대조군과 차이가 없어, 비전형적인 세포비의 증가와 냉동기간과의 연관성을 관찰할 수 없었다(Fig. 6).

라. 지방세포 미토콘드리아 활성 측정

취약한 지방세포가 단순 파괴된 부산물(0군)의 OD는 1.304였으며, 냉동 1, 2, 3, 6개월의 OD는 각각 0.848, 1.007, 0.791, 0.836으로 측정되었다. 시간적 경과에 따른 OD의 감소는 35%, 23%, 39%, 35%로서, 냉동 1개월 시점에서 이미 미토콘드리아 활성이 감소되는 소견을 보였으나, 냉동기간이 장기화됨에 따른 미토콘드리아 활성 변화는 없었으며, 냉동 전 기간에 걸쳐서 지방세포의 미토콘드리아 활성이 50% 이상 유지되는 소견을 보였다(Fig. 7).

IV. 고 찰

이식된 지방의 흡수는 2단계로 진행된다. 먼저 취약한 지방세포가 파괴되는 세포수의 감소가 일어난 후, 파괴된 지방세포에서 유출된 지질성분이 흡수되어 최종적인 부피 감소가 일어나기 때문에 살아있는 세포의 수와 지방세포의 형태 및 부피 유지 모두가 이식된 지방의 생착에 중요한 역할을 담당한다고 볼 수 있다.^{2,3} 세포손상(cellular damage)은 세포손상이 전무한 단계(1단계, grade I), 가역적 세포손상(2단계, grade II), 비가역적 세포손상(3단계, grade III)의 3단계로 나뉜다. 가역적 세포손상은 세포부종(edema), 미토콘드리아 팽윤(swelling) 및 세포형태의 변화가 나타나지만 아직 세포막 파괴는 없는 단계이며, 비가역적 세포손상은 세포막의 파괴 및 미토콘드리아 막의 파괴로 표현된다.^{11,12} 즉 세포손상의 가역성을 결정하는 것은 세포막의 보존 여부와 밀접한 관계가 있으며, 세포 보관방법 중 하나인

냉동보관(cryopreservation) 역시 냉동보존의 주 목적은 세포막의 안전한 보존에 있으며, 채취 당시의 세포막의 손상 정도가 세포의 기능 유지와 밀접한 관련을 지니고 있다. 냉동보관으로 인한 세포손상은 세포가 어떠한 온도에 어떤 속도로 노출되느냐에 따라 한랭손상(cold injury)의 정도가 다르다. 냉동으로 인한 세포손상의 기전은 크게 세포 내 얼음결정(ice crystal) 형성과 냉동되는 과정에서 삼투압에 의한 세포의 탈수현상(dehydration)으로 나뉘며,^{12,13} 지방세포는 영하 20℃ 완속냉동(slow freezing) 시에 7일까지 보관 시 이러한 한랭손상을 최소화할 수 있다는 실험결과가 있으나,¹ 장기간 냉동 시에도 이러한 손상이 최소화되는 지에 대한 연구는 아직 미진하다. 특히, 지방이식에 사용되는 지방세포는 이미 채취 단계에서 세포질의 팽윤 및 세포막의 약화가 일어난 상태이므로 약화된 세포의 장기 냉동보관 시의 변화에 대한 연구가 필요하다.

지방세포의 생존력 연구는 지방이식을 받은 환자의 수술 전후 사진 비교, H & E 염색을 통한 세포형태의 관찰, trypan blue 염색을 통한 살아있는 세포의 염색,¹ G3PDH 등의 효소검사,¹⁴ 세포의 미토콘드리아 활동도를 측정하는 XTT 검사 방법이나,² MTT 검사 방법 등^{4,5} 이 있다. 그 외의 지방세포 분석 방법으로 동정이 어려운 지방세포를 직접적으로 분석하는 것이 아니라, 지방세포에서 생성되는 유리 지방산들을 분석하는 방법을 통해서 지방세포의 지방분해(lipolysis) 능력을 파악하는 방법도 연구되고 있다.¹⁵ 그러나, 임상에서 흡입지방 세포들은 세포주변의 간질조직(stromal tissue)을 완전 제거, 순수한 지방세포만으로 분리하기가 어렵고, 미세한 실험조건의 변화에도 생존력의 변화가 클 뿐 아니라, 지방세포의 분리(isolation) 과정을 거치면서 세포파괴의 가능성이 높은 단점이 있다.⁵ 또한 변형된 세포의 형태 유지 정도와 살아있는 세포 수를 함께 측정하는 것

이 보다 정확한 지방세포의 생착 정도를 예측할 수 있기 때문에, 어느 한 가지 방법만으로는 정확한 지방세포의 생존능력 연구가 어려운 측면이 있다. 이에 저자들은 채취 직후의 지방조직, 즉, 지방조직을 채취할 당시 여러 가지 채취 과정을 통해 이미 취약해진 지방세포가 냉동과정과 무관하게 단순파괴되는 경우를 대조군으로 하여 효과적인 지방세포 보관 온도로 알려진 영하 20℃ 냉동보관된 지방세포들의 육안적 부피 감소 및 형태학적 변화를 관찰하여 냉동기간에 따른 세포파괴의 정도, 지질성분의 분석을 통해 냉동으로 인한 세포 변성 정도를 파악하고, 냉동된 세포의 미토콘드리아 활동도 변화를 측정, 각각의 결과를 비교하고 이를 토대로 냉동지방의 생존력 및 세포냉동의 안정성을 파악하여 효과적인 냉동기간을 알아보았다.

냉동된 지방세포의 육안적 부피 변화에 대한 실험결과, 지방세포의 부피는 냉동 1, 2개월 동안은 변화가 적

고, 냉동 3개월째 이르러 급속한 감소를 보였으나, 냉동 3개월 이후에는 추가적인 감소 소견은 없었다(Table II, III, Fig. 2). 지방세포의 변성(denaturation)이나 형태학적 변화를 제외한 육안적 지방세포의 변화만으로 본다면 영하 20°C 냉동은 냉동 3개월을 지나면서 부피 감소가 나타나므로 냉동 3개월 이전까지는 비교적 안전한 보관 방법이며, 냉동기간이 길어짐에 따라 추가적인 변화는 없으므로 냉동으로 인한 효과는 초기 3개월 이내에 결정된다고 가정할 수 있다. 물론 이러한 변화가 과연 실제 냉동보관된 지방세포의 정상 변화와 일치하는지 알 수 없으므로, 이 때의 부산물의 성분 분석과 육안적으로 형태가 유지되는 지방세포의 형태 및 미토콘드리아 활성 분석을 통해, 냉동된 지방세포의 변화를 함께 파악하는 것이 중요하다. 일반적으로 지방세포 채취 당시 취약한 세포의 조작과정에서 일어나는 외력에 의한 세포 파괴의 결과는 세포내 구성물의 유출로 인한 부피의 감소 및 세포형태의 변화를 일으킬 수 있지만, 세포내 구성물의 조성을 변화시키고 불안정한 불포화지방산의 가수분해를 유발하지는 않으며, 동 중간에는 일반적으로 비슷한 지질 조성은 유지된다. 최근 냉동보관된 피부세포의 연구,¹³ 흉부외과 영역에서 판막(valve)의 보관,⁷ 불임(sterility) 영역에서 난자, 정자의 냉동보관에 대한 실험 결과, 세포 냉동보관 시 열에너지가 소실되는 과정에서, 세포막의 주성분인 인지질(phospholipid) 및 당지질(phospholipid)을 포함한 세포내 지질성분의 변성이 일어나며, 그 결과 지질 조성의 변화가 유발되고, 세포 변성이 가속화된다고 하였다. 특히 불안정한 불포화지방산의 가수분해가 일어나며 상대적 탄소수가 많은 다가불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid)의 비율이 감소할수록, 지질성분의 조성 변화가 클수록 세포손상이 크다고 알려져 있다.^{6,8} 지방세포는 세포막뿐 아니라, 세포내 대부분의 성분이 글리세라이드, 콜레스테롤에스터, 당지질, 인지질 등 지질로 딱 차있는 세포로서 지방세포가 파괴될 때 세포내 성분인 지질이 외부로 유출되므로, 이러한 지질류의 변화가 다른 세포보다 쉽게 측정 가능하다.⁹ 따라서, 지방세포가 파괴될 때 유출된 지질 및 지방산의 조성 및 함량 변화는 변성된 지방세포의 증가로 해석될 수 있다. 본 실험에서 이들 냉동보관된 지방세포의 부산물을 이용하여, 냉동보관 기간 동안의 지방세포의 변성 정도를 측정하였는데, 세포막의 파괴와 부가 반응(adverse reaction)이 유발될 경우 민감하게 변화할 것으로 예측되는 총 지방산의 조성

및 함량이 냉동 전 기간에 걸쳐 비교적 일정하게 유지되었으며, 냉동 전 기간에 걸쳐 유출된 지질의 조성 역시 취약한 지방세포가 단순 파괴된 부산물인 대조군과 차이가 없었다(Table IV, Fig. 3). 결국, 육안적으로 관찰된 냉동 3개월 시 증가된 부산물은 지방추출을 위한 각종 조작 과정에서 세포막이 취약해진 지방세포들이 파괴되어 그 세포막과 지질 내용물이 단순 유출된 총량(summation) 이라고 보여지며, 영하 20°C 냉동보관은 지방세포에 해로운 부가반응을 유발하지 않음을 가정할 수 있다. 이러한 사실들은 또한 특히 불안정한 상태로 존재하여 세포변성이 유발되면 감소되는 다가불포화 지방산의 유의 있는 변화 역시 나타나지 않은 점으로 확인될 수 있다(Table V, Fig. 4).

그 외, 냉동된 지방세포에 대한 직접적인 형태학적 변화를 관찰한 결과, 주사기 흡입(syringe suction)을 실시하였을 때, 대개의 지방세포가 정상 지방세포와 같은 둥근 모양을 유지하고 있으며 20% 정도에서 파괴되거나 형태가 신장(elongation)된 비전형적인 지방세포들이 관찰되었다(Fig. 5). 냉동보관된 지방세포의 경우, 냉동 1, 3, 5, 6개월 지방세포의 형태학적 모양은 흡입 직후의 지방세포의 모양과 유사한 형태를 보였다(Fig. 6, Above left & right, Below center, Right). 다만 냉동 2개월의 경우 부분적으로 비전형적인 세포들의 비율이 40%정도까지 증가하는 소견이 관찰되었고(Fig. 6, Above center), 냉동 4개월 시 30%로 증가된 소견을 보였는데(Fig. 6, Below left), 이러한 냉동 2,4개월의 비전형적인 세포비율의 부분적인 증가는 지방세포를 H & E 염색하는 과정에서 거치게 되는 세포원심분리(cyocentrifuge)와 세포군집 절편(cell block) 과정에 의한 세포파괴 결과로 사료되며, 냉동기간에 따른 유의적 차이는 없는 것으로 보인다. 따라서 냉동 5, 6개월까지 보관된 지방세포의 형태학적 모양이 흡입 직후의 지방세포의 모양과 유사한 형태를 보이며(Fig. 6), 세포 부산물 성분 분석 결과와 일치되는 것으로 미루어 볼 때, 냉동 자체가 지방세포 변성을 유발하지는 않는 것으로 파악될 수 있다. 또한 흡입 지방세포들은 약간의 조작에도 세포파괴의 가능성이 높으므로, 취약한 흡입 당시의 세포손상을 최소화 하는 것이 중요함을 다시 한번 확인할 수 있다 그러나, H & E 염색을 통한 지방세포형태 관찰 외에 취약한 냉동 지방세포의 추가적인 손상 없이 세포형태를 정확하게 관찰할 수 있는 보다 안정된 지방세포 염색법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보이며, 이러한 방법 외에

실제 생체 내 이식되어 생착과 밀접한 관련을 지니는 부분인 냉동된 지방세포에 대한 직접적인 세포 활성도 분석이 보다 중요하다.

XTT 분석법은 미토콘드리아의 호흡사슬에 존재하여 생존세포에만 활성이 있는 succinate-tetrazolium-reductase에 의해 Tetrazolium salt가 분광광도법으로 측정이 가능한 수용성의 청색의 formazan 결정을 형성하는 특성을 이용하는 방법으로, 생존 세포수가 증가하면 시료 중의 미토콘드리아 탈수소효소 전체의 활성이 증가하고, 이 효소 활성의 증가가 formazan 색소의 생성 증가를 유도하기 때문에 formazan 색소와 배지 중의 대사 활성이 있는 세포의 수와는 직선적인 상관을 나타내게 된다. 특히 XTT formazan의 흡광도는 490 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 OD는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.^{2,11} 실험 결과 대조군과 비교 시 냉동군에서 냉동기간에 따른 OD 변화는 모든 경우에서 50% 이하의 수치 감소를 보였다 (Fig. 7). 즉, 영하 20°C 냉동 보존된 세포의 미토콘드리아 활성은 이미 냉동 1개월 시 35%로 감소된 결과를 보였으나, 냉동기간에 따른 추가적인 감소는 없었다. 그러나, 미토콘드리아 활성의 감소는 세포손상 단계 중 비가역적 세포손상(3단계 세포손상)과 밀접한 연관이 있을 뿐 아니라, 미토콘드리아 활성도가 낮다는 것은 잠재적 Apoptosis와 밀접한 관련이 있다는 연구 결과들을 종합해 볼 때,¹⁶ 지방세포의 채취 단계에서 세포막의 손상을 입어 가역적 세포손상 단계에 진입한 지방세포들은 영하 20°C 냉동 환경을 견디지 못하고 냉동 1개월 이내에 이미 비가역적 손상 단계로 진행하여 미토콘드리아 활성의 감소가 나타났음을 알 수 있다. 또한 이러한 미토콘드리아 활성 감소가 냉동기간에 따라 추가적으로 감소하지 않는 것으로 보아, 냉동 당시 취약한 지방세포들 대부분이 냉동 1개월 이내에 이미 비가역적 손상 상태로 진행되었으며, 반면 냉동 시점에 정상 소견을 보이는 지방세포들은 냉동 과정을 거치면서 비가역적 변화를 보이지는 않는 것으로 가정할 수 있다. 물론 냉동보관된 지방세포의 미토콘드리아 활성 감소가 23 - 39% 정도로 나타난 본 실험 결과, 지방세포를 냉동보관 시에 비가역적 세포손상(3단계 세포손상) 및 Apoptosis로 진행되는 세포가 23 - 39% 이상일 가능성이 높아, 채취 직후의 지방세포와 비교해 보면 세포손상이 큰 보관방법임에는 틀림없다. 그러나, 냉동이라는 상태에서 살아있는 세포의 미토콘드리아 활성도 자체가 낮게 측정되는 면을 감

안하고, 냉동보관을 하지 않은 경우에 지방세포의 미토콘드리아 활성이 보관 일주일 이내에 70% 이상 감소되는 연구 논문들과 비교해 본다면,^{4,5} 지방세포를 보관해야 할 경우에는, 영하 20°C 냉동보관이 세포손상을 적게 하는 보관 방법임에는 틀림없다.

결론적으로 냉동 기간별로 지방세포의 부피변화 및 지질층 분석, 형태학적 변화 및 미토콘드리아 활성 측정 결과를 종합해 볼 때, 지방세포들의 영하 20°C 장기간 냉동보관은 1단계 세포손상 지방세포의 변화를 일으키지 않아 세포형태나 세포용적이 유지되는 효과적인 보관방법이나, 채취 당시 흡입과정을 포함한 각종 조작들로 세포벽이 약화되어, 2단계 세포손상으로 진행된 지방세포들은 영하 20°C 냉동 환경을 견디지 못하고 냉동 1개월 이내에 이미 3단계 세포손상인 비가역적 손상으로 진행하게 되며, 비가역적 손상 단계에 진입한 지방세포들은 서서히 세포막의 파괴와 내용물의 유출이 일어나, 냉동 3개월을 전후하여 세포 파괴 및 내용물 유출이 완료됨을 가정할 수 있다. 즉, 냉동 3개월 이후의 유의한 지방세포의 부피감소는 채취 당시 취약한 지방세포의 단순파괴 및 미토콘드리아 활성이 떨어지거나 이미 세포형태의 변형이 일어난 지방세포에서 유출된 내용물의 단순 흡산 결과이며, 냉동 자체로 인한 추가적인 지방세포의 변성(denaturation)이나 부가반응(adverse reaction)으로 인한 성분변화는 없으며, 6개월 동안 장기간 보관 시라도 세포막 손상이 없는 지방세포의 경우 그 모양과 상태가 냉동 전 상태와 일정하게 유지되므로 냉동보관된 지방세포의 생체내 재주입(reinjection)이 비교적 안전한 방법임을 확인할 수 있었다.

따라서, 지방세포의 생착률을 최대화하기 위해서는 미토콘드리아 활성도가 최대로 유지되는 냉동 이전의 상태 혹은 냉동기간을 최소로 하는 시점이 좋으나, 실제 임상에서 냉동지방의 이용 가능한 시기는 이식된 지방의 완전한 생착이 이뤄지는 시기인 이식 후 1개월 이후이므로,³ 영하 20°C에서 1개월 이상 지방세포를 냉동보관 시 가역적 손상에서 비가역적 손상으로 진행되는 정도가 최소화되고, 부피 및 형태가 채취 직후의 지방세포와 유사하게 유지되는 시점인 냉동 3개월 이전의 지방세포를 이용하는 것이 지방이식으로 인한 최대의 부피 확장 효과를 얻을 수 있을 것으로 보여진다. 그러나, 본 실험결과 채취 단계에서 취약한 지방세포의 장기간 냉동보관이 어려우므로, 손상받지 않은 지방세포를 채취

할 수 있는 방법에 대한 자세한 연구가 필요할 뿐 아니라, 가역적 손상세포들이 비가역적 손상단계로 진행되지 않고, 미토콘드리아 활성을 유지할 수 있는 냉동 조건에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 보여지며, 이러한 냉동보관된 지방세포를 실제 생체 내 이식하였을 때, 생착률 변화와의 연관성에 대해서도 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

채취 당시 2단계 세포손상으로 진행된 지방세포들은 -20°C 냉동 1개월 이내에 비가역적 손상으로 진행하게 되어, 냉동 3개월을 전후하여 채취된 지방의 유의한 부피감소가 유발되나, 이 때의 부피감소는 손상된 지방세포의 단순 파괴와 미토콘드리아 활성이 떨어지고 이미 세포형태의 변형이 일어난 지방세포에서 유출된 내용물의 결과로서, 냉동 자체로 인한 추가적인 지방세포의 변성이나 부가반응으로 인한 지질성분의 변화는 없었다. 또한 6개월 동안 냉동보관 시라도 50% 이상의 미토콘드리아 활성을 유지되면서 형태와 부피가 일정하게 유지되었다. 이로써, 지방세포의 -20°C 냉동보관은 안전하고 효과적인 방법임을 확인할 수 있었으며, 이식 시 수혜부의 연부조직 형태와 부피유지를 최대도 유지할 수 있기 위해서는 지방세포의 부피가 최대도 유지되는 냉동 3개월 이전의 지방세포를 이용하는 것이 지방이식으로 인한 최대의 부피 확장 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 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
- Rohrich RJ, Evan SS, Spencer AB: In Search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg* 113: 391, 2004
- Boschert MT, Beckert BW, Puckett CL, Concannon MJ: Analysis of lipocyte viability after liposuction. *Plast Reconstr Surg* 109: 761, 2002
- MacRae MW, Tholpady SS, Ogle RC, Morgan RF: Ex vivo fat graft preservation: effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg* 52: 281, 2004
- MacRae MW, Tholpady SS, Katz AJ, Gampper TG, Drake DB, Ogle RC, Morgan RF: Human Adipocyte viability test: a new assay. *Aesthetic Surg J* 23: 265, 2003
- Miller RR Jr, Sheffer CJ, Cornett CL, McClean R, MacCallum C, Johnston SD: Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo(*Macropus giganteus*), koala(*Phascolarctos cinereus*) and common wombat(*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. *Cryobiology* 49: 137, 2004
- Vazquez MER, Roman TD, Cuesta MG, Botta CZ, Ibanez JS, Diaz SP, Nunez CA: Viability and histologic structure of porcine valves after cryopreservation. *Ann Thorac Surg* 77: 186, 2004
- Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH: Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* 33: 589, 1996
- Farkas J, Angel A, Avigan MI: Studies on the compartmentation of lipid in adipose cells. II. Cholesterol accumulation and distribution in adipose tissue components. *J Lipid Res* 14: 344, 1973
- Ewaldo Bolivar de Souza Pinto, Sandra Marcia da Silva Moia, Milla Nery Machado and Sergio Tavolaro Pereira. Morphologic analysis of fat tissue in areas treated with lipoplasty. *Aesthet Surg J* 22: 513, 2002
- Lu JH, Chiu YT, Sung HS, Hwang B, Chong CK, Chen SP, Mao SJ, Yang PZ, Chang Y: XTT-colorimetric assay as a marker of viability in cryoprocessed cardiac valve. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1189, 1997
- Liu XH, Zhang T, Rawson DM: Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 55: 1719, 2001
- Seo KI, Huh CH, Han JH, Youn JI, Lee CH, Lee WJ, Eun HC: Characterization of cryopreserved human Langerhans cells. *Cryobiology* 45: 118, 2002
- Lalikos JF, Li YQ, Roth TP, Doyle JW, Matory WE, Lawrence WT: Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. *J Surg Res* 70: 95, 1997
- Muller G, Jordan H, Jung C, Kleine H, Petry S: Analysis of lipolysis in adipocytes using a fluorescent fatty acid derivative. *Biochimie* 85: 1245, 2003
- O'Connell M, McClure N, Lewis SEM: The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 17: 704, 2002