

# 1년 이상 냉동 보관한 흡인 지방조직 내의 세포 생존

손대구<sup>1</sup> · 오재훈<sup>2</sup> · 최태현<sup>1</sup> · 김준형<sup>1</sup> · 한기환<sup>1</sup>

계명대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, 가가성형외과<sup>2</sup>

## Viability of Cells in Aspirated Fat Tissue after 1 Year Cryopreservation

Daegu Son, M.D.<sup>1</sup>, Jaehoon Oh, M.D.<sup>2</sup>,  
 Taehyun Choi, M.D.<sup>1</sup>, Junhyung Kim, M.D.<sup>1</sup>,  
 Kihwan Han, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic and Reconstructive Surgery,  
 Keimyung University Dongsan Medical Center, Daegu;

<sup>2</sup>Gaga Aesthetic Plastic Surgical Clinic, Daegu, Korea

**Purpose:** The use of an autogenous fat graft has become a common procedure in plastic surgery. However, questions remain concerning on the viability of fat cells and preservation method of aspirated fat. The purpose of this study is to examine the viability of fat cells stored at -20°C in the freezer for 1 year after harvest from abdominal liposuction.

**Methods:** Eighteen adults(aged from 24 to 65 years, 16 female and 2 male) were selected for this study. Harvested aspirated fat tissues were obtained by suction-assisted lipectomy and frozen at -20°C commercial refrigerator for one year(average 12.5 months). The viability of fat cells in specimens were measured after thawing. The numbers of viable cells were measured on a fluorescence microscope after staining with fluorescein diacetate and propidium iodide. GPDH(Glycerol-3-phosphate dehydrogenase) activity was measured. Cell culture was done for 3 weeks.

**Results:** There were no viable cells under the fluorescence microscope, no detectable GPDH activity, and no cultured cells.

**Conclusion:** These findings suggest that aspirated fat after frozen storage for one year at -20°C freezer is inadequate to reuse.

**Key Words:** Fat cells, Cryopreservation

Received September 16, 2008

Revised November 18, 2008

Accepted January 23, 2009

**Address Correspondence:** Daegu Son, M.D., Ph.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Keimyung University Dongsan Medical Center, 194 Dongsan-dong, Daegu 700-712, Korea. Tel: 053) 250-7636 / Fax: 053) 255-0632 / E-mail: handson@dsmc.or.kr

## I. 서 론

자자지방이식술은 성형외과에서 미용 혹은 재건 목적으로 많이 사용되고 있으며, 임상에서 점점 더 그 이용영역이 넓어지고 있다. 그러나 이식된 지방의 생존율은 연구자에 따라 30 - 80% 정도로 매우 다양하게 보고하고 있어 아직도 논란이 되고 있다.<sup>1-3</sup> 그 이유는 공여부 마취방법, 지방채취방법, 채취에 사용한 기구, 지방이식 방법, 재이식 시기, 그리고 분석방법 등이 술자마다 달라 비교 연구가 쉽지 않기 때문이다.<sup>4-6</sup>

이식된 지방의 다양한 생존율 보고와 더불어 많게는 70%나 되는 지방이식의 흡수율을 낮추기 위해서 지방 채취에서 이식에 이르기까지 많은 노력을 기울여 상당히 흡수율을 줄였지만 아직 그 결과가 만족스럽지 못하다. 결과적으로 원하는 목표만큼의 연조직 증대를 얻기 위해서는 재이식을 할 수밖에 없다. 재이식술을 할 때마다 신선한 지방을 환자에게서 다시 채취하여 이식하는 것이 가장 이상적이겠지만 임상 의사들은 환자의 불편을 고려하여 처음에 많이 채취하여, 쉽게 구입할 수 있는 가정용 냉장고의 냉동실에 보관하였다가 재사용하는 방법을 흔히 이용하고 있다. 이 냉동실의 온도는 대략 -20°C 정도이며, 이곳에 보관하였던 흡인지방을 경험적으로 약 3 - 12개월 까지 재사용하고 있으며 어느 정도의 효과를 얻고 있다. 그러나 기초연구가 미흡하고 경험에만 의존하고 있어 일관된 예측 가능한 결과를 얻지 못하고 있다.

냉동 보관한 지방이 시간이 지남에 따라 얼마나 생존하는지에 대한 연구는 연구자에 따라 그 결과를 매우 다양하게 보고하고 있다. Schuller-Petrovic<sup>7</sup>은 -20°C에 서서히 얼려서 냉동 보관한 지방은 손상을 받지 않고, 녹였을 때 많은 지방세포가 살아 있었다고 하였고, Sommer와 Sattler<sup>8</sup>는 -20°C에 심지어 3년간 냉동 보관한 지방에서도 생존된 지방세포를 보고하였으며, Wolter 등<sup>9</sup>은 -20°C에 냉동 보관하여 2일이 지나면 많은 지방세포들이 파괴되기 때문에 이렇게 보관한 지방을 이식하는 것은 죽은 세포를 이식하는 것과 같다고 하였다. 이와 같이 상당히 상반된 연구결과들로 인해 임상 의사들은 오히려 더 큰 혼선을

받고 있다. Liu 등<sup>10</sup>의 연구에 의하면 -20°C에서는 세포가 부분적으로 얼기 때문에 세포 대사활성이 다소 남아있다고 한다.

이 연구의 목적은 일반적으로 임상 의사가 지방 보관 방법으로 많이 이용하고 있는 일반 냉장고의 냉동실 온도인 -20°C에 흡인된 지방을 보관하여, 1년 이상 경과되었을 때 지방세포가 얼마나 생존하는지를 객관적인 분석 방법으로 정확히 알아보고자 하는 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 지방채취 및 보관

18명의 환자(여자 16명, 남자 2명; 24 - 65세(평균 36.4 세))를 대상으로 하였다. 지방을 채취하기 전에 tumescent 용액(Hartmann 1,000 mL, 2% lidocaine 20 mL, 1 : 1,000 epinephrine 1 mL)을 흡입부위에 골고루 주사한 후 약 5 분 동안 기다렸다가, 지방흡입술로 지방을 채취하였다. 채취한 지방을 10 cc 주사기에 옮겨 담은 후 3000 rpm으로 2분간 원심 분리한 후 기름층을 제거하고 -20°C 냉동실에서 1년(평균 12.5개월) 동안 보관되었던 지방을 이용하였다. 대조군으로 6명의 환자(여자, 23 - 46세(평균 30.5세))에서 동일한 방법으로 채취한 신선한 지방에서 성숙한 지방세포 수와 GPDH를 측정하였고, 5명의 환자(여자, 22 - 36세(평균 31.4세))에서 채취한 신선한 지방에서 지방전구세포배양을 시행하였다.

### 나. 성숙한 지방세포 분리 및 생존 지방세포 수 측정

냉동 보관된 지방을 꺼내 상온에서 서서히 녹인 후 PBS(Phosphate buffered saline: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 세척하고 2 g의 시료에 1 mg/mL의 type I collagenase(type I: Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)와 0.9 mg/mL의 glucose, 그리고 1.5% bovine serum albumin이 포함된 PBS 20 mL를 처리하여 배양기에서 분해반응 시킨 후, 10% FBS(Hyclone, Logan, UT, USA)가 포함된 동일양의 DMEM으로 분해반응을 중지시켰다. 200 μm strainer로 걸러 분해되지 않고 남은 조각들을 제거하고, 1000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층부에 존재하는 성숙한 지방세포를 분리하였다. 환자로부터 분리한 지방세포 부유액 1 mL에 5 mg/mL의 fluorescein diacetate 20 μL와 0.5 mg/mL의 propidium iodide 1 μL를 첨가하여 2분간 염색 후, 10 μL의 세포 부유액을 1회용 Hemocytometer(C-Chip: Digital Bio, Seoul, Korea)에 넣은 후 Axiovert 200 Microscope(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)으로 50배에서 생존해 있는 지방세포의 수를 측정하였다. 형광 현미

경으로 관찰하여 세포가 초록색으로 염색된 생존한 지방세포와 핵이 붉은 색으로 염색된 죽은 세포의 수를 측정하였다. 이때 지방세포 크기는 최대 150 μm 이하로 정하였고,<sup>11</sup> 이 크기를 초과하며, 초록색을 띠지 않는 것은 지질방울(lipid droplet)로 보고 세포수 측정에서 제외시켰다 (Fig. 1).

### 다. GPDH(Glycerol-3-phosphate dehydrogenase) assay

손상되지 않은 지방세포 내의 GPDH(intracellular GPDH)와 손상된 지방세포 외의 GPDH(extracellular GPDH)를 함께 측정하여 전체 GPDH를 100%로 환산하고, 손상되지 않은 지방세포 내의 GPDH를 %로 평가하였다.

흡인지방 1g에 1 mL의 PBS(Phosphate buffered saline: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 넣어 섞은 후, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 세포외 효소를 얻고, 다시 1 mL의 PBS를 넣어 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포외 효소, 즉 손상된 지방세포 외의 GPDH 얻었다. 다시 2 mL의 PBS를 넣고 Homogenaze(IKA T18 basic ULTRA-TURRAX: IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)를 이용하여 지방세포를 깨뜨린 후, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 손상되지 않은 지방세포 내의 GPDH를 얻었다.

100 mM triethanolamine-HCl(Tris: Sigma), 2.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA: Sigma), 0.1 mM 2-mercaptoethanol(β-mer: Sigma)의 혼합물에 원심분리된 지방세포를 더한 후 측정하기 바로 전에 0.16 mM nicotinamide adenine dinucleotide(NADH: Sigma)와 20 μL의 dihydroxyacetone phosphate(DHAP: Sigma)를 혼합하였다. GPDH는 NADH와 DHAP가 함께 반응하면 NAD와 glycerol-3-phosphate로 바뀌므로, Spectrophotometer(Spectronic Instruments Inc., Rochester, NY, USA)를 이용하여 NADH의 농도변화를 340 nm 흡광도에서 5분 동안 30초마다 측정하였다.

### 라. 세포배양

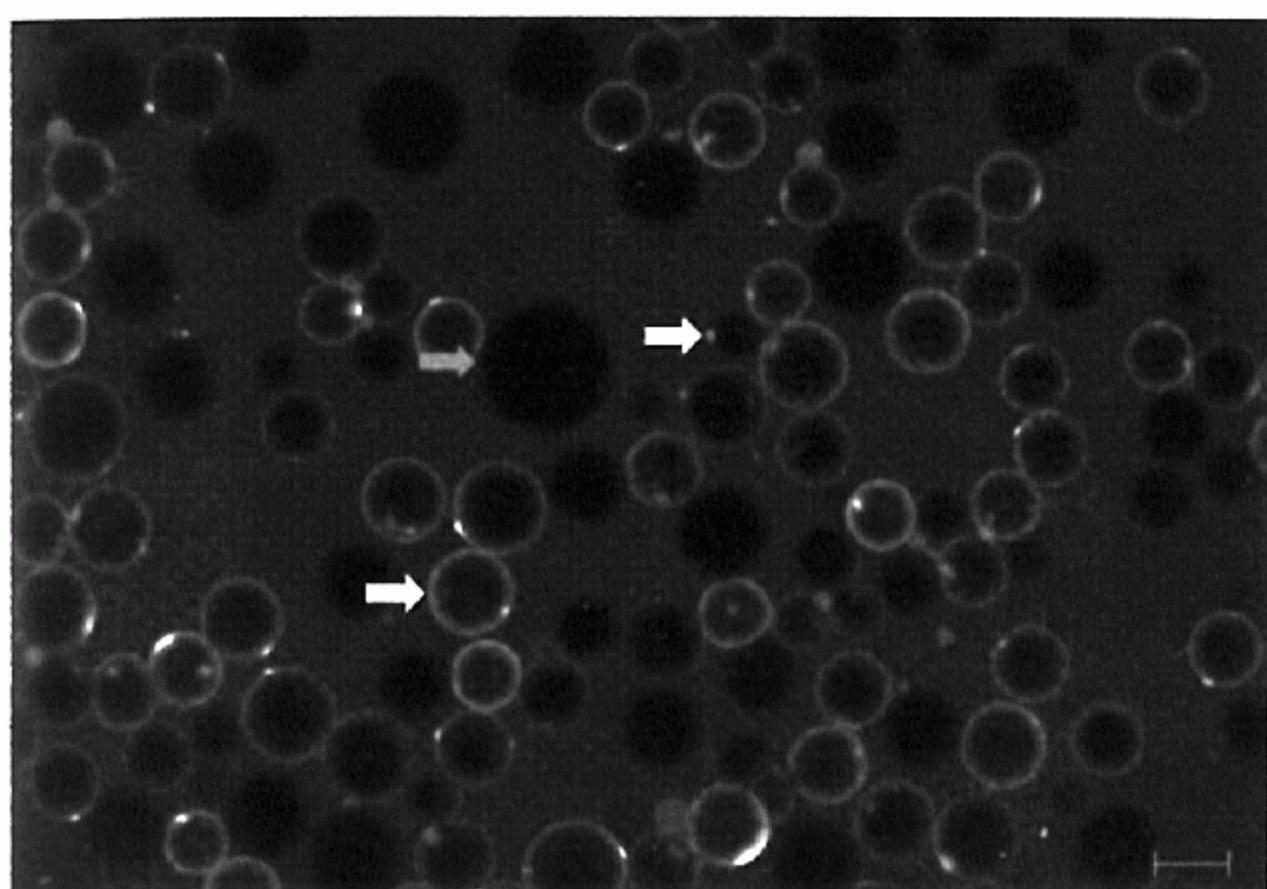
보관한 지방을 꺼내 상온에서 녹인 후 PBS로 세척하고, 2 g의 시료에 1 mg/mL의 type I collagenase와 0.9 mg/mL의 glucose, 그리고 1.5% bovine serum albumin이 포함된 PBS 20 mL를 처리하여 배양기에서 분해반응 시킨 후 10% FBS가 포함된 DMEM으로 분해반응을 중지 시켰다. 200 μm strainer로 걸러 분해되지 않고 남은 조각들을 제거하고, 1000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층부의 부유 세포를 분리하고, 남은 부분을 다시 1200 rpm에서

10분간 원심 분리한 뒤 상등액은 버리고 침전물(pellet)을 부유하여  $100\text{ cm}^2$  배양용기에 접종하여 3주간 배양하였다. 대조군으로 사용한 신선한 지방은 6일간 배양하였다.

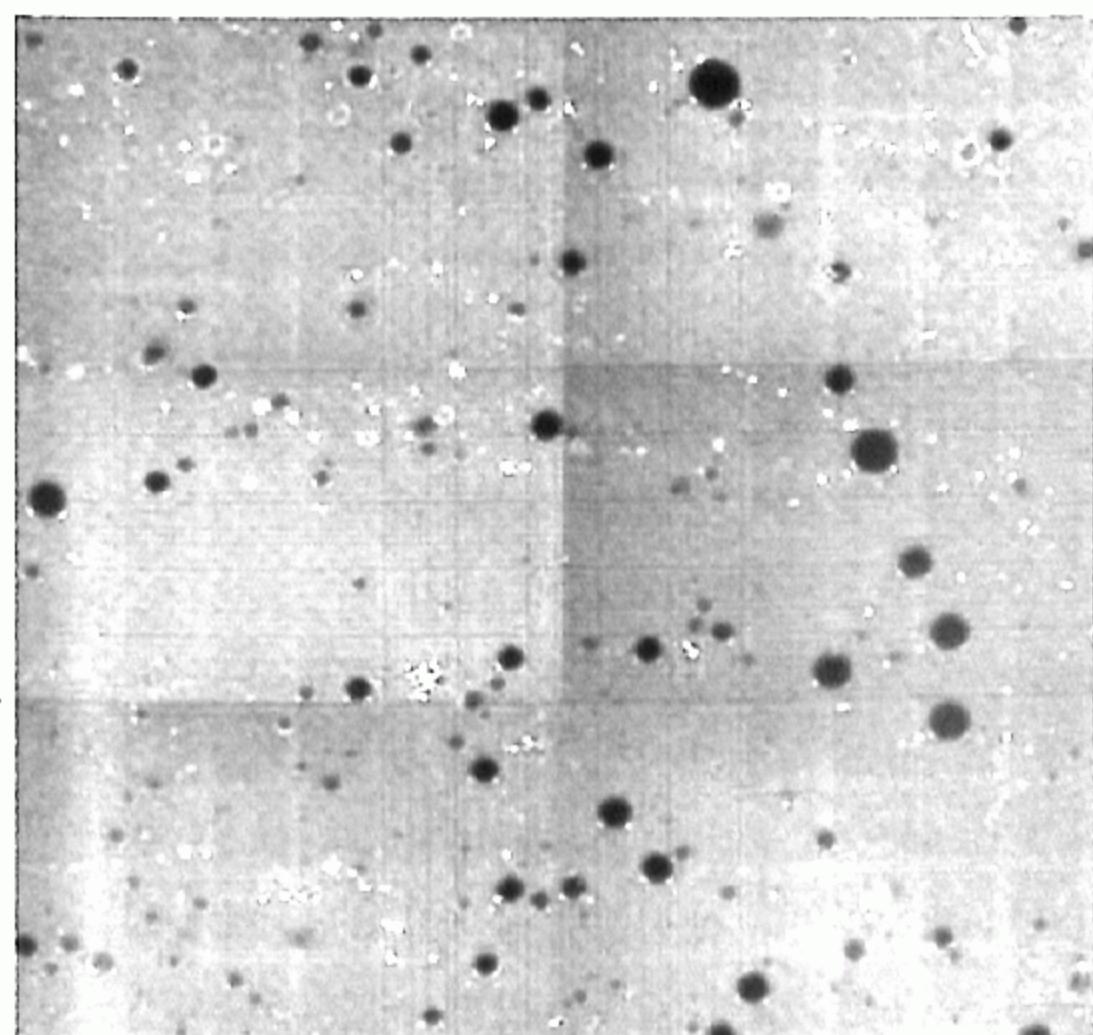
### III. 결 과

#### 가. 성숙한 지방세포 수

1년 이상 냉동보관 되었던 지방을 형광현미경으로 관찰하였을 때, 신선한 지방으로부터 분리한 성숙한 지방세포와 같이 염색된 살아있는 세포(Fig. 1)는 없었으며, 지질방울이나 세포 부스러기(cell debris) 등의 이물들만 관찰되었다(Fig. 2). 반면에 대조군 즉, 신선한 지방에서는 평균 82%의 살아있는 성숙한 지방세포를 관찰할 수 있었다



**Fig. 1.** Representative view of adipocytes in a single cell suspension and after FDA-PI staining under a fluorescent microscope. White arrows indicate viable adipocytes; yellow arrows indicate propidium iodide-stained nuclei; Red arrows indicate oil(magnification  $\times 50$ ). Scale bar=100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 2.** Representative view of a specimen after freezing at  $-20^\circ\text{C}$  for 1 year showing dead cell with debris and oil.

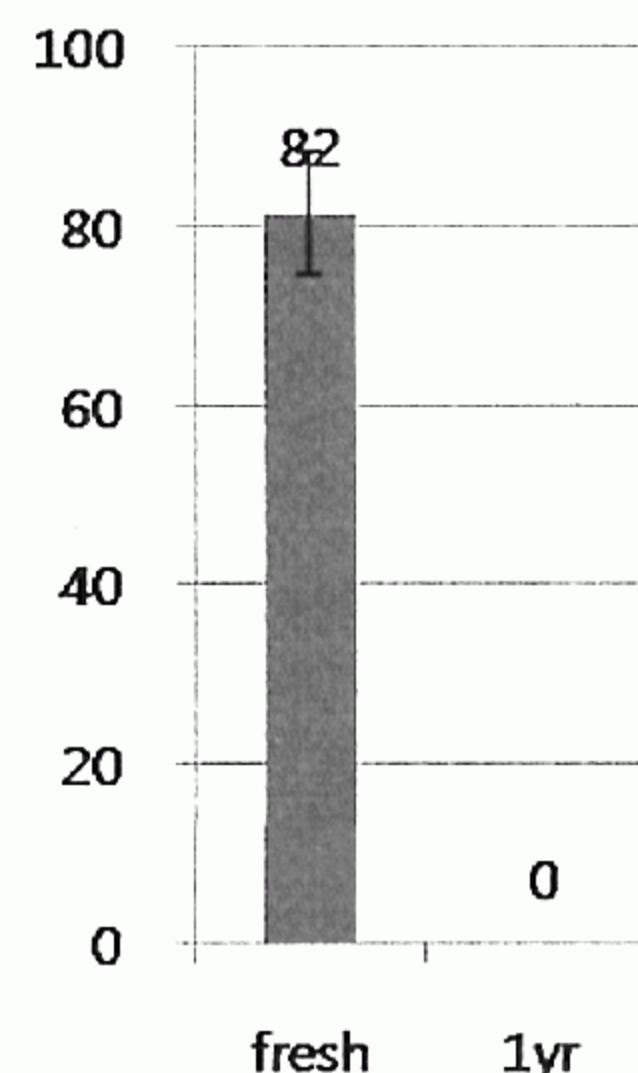
(Fig. 3).

#### 나. GPDH assay

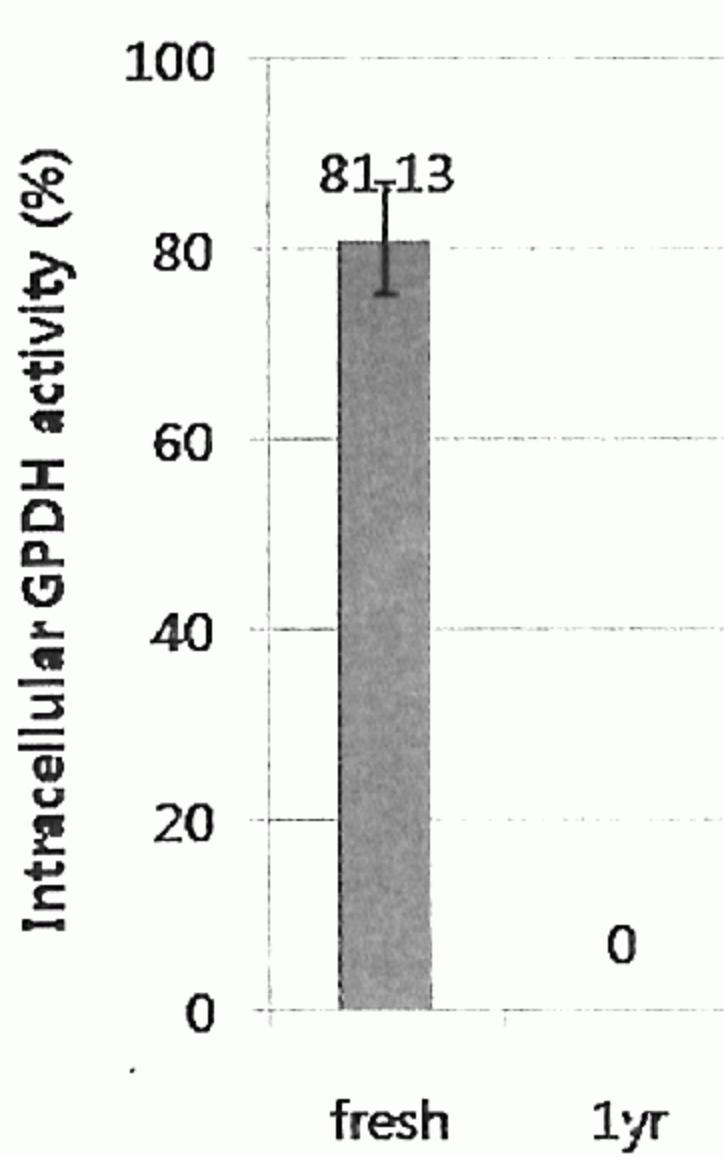
1년 이상 냉동 보관되었던 지방에서 spectrophotometer를 이용하여 NADH의 농도변화를 340 nm 흡광도를 측정하였을 때 흡광도는 0이었다. 반면에 대조군 즉, 신선한 지방에서 측정한 intracellular GPDH는 평균 81.13% 이었다(Fig. 4).

#### 다. 세포배양

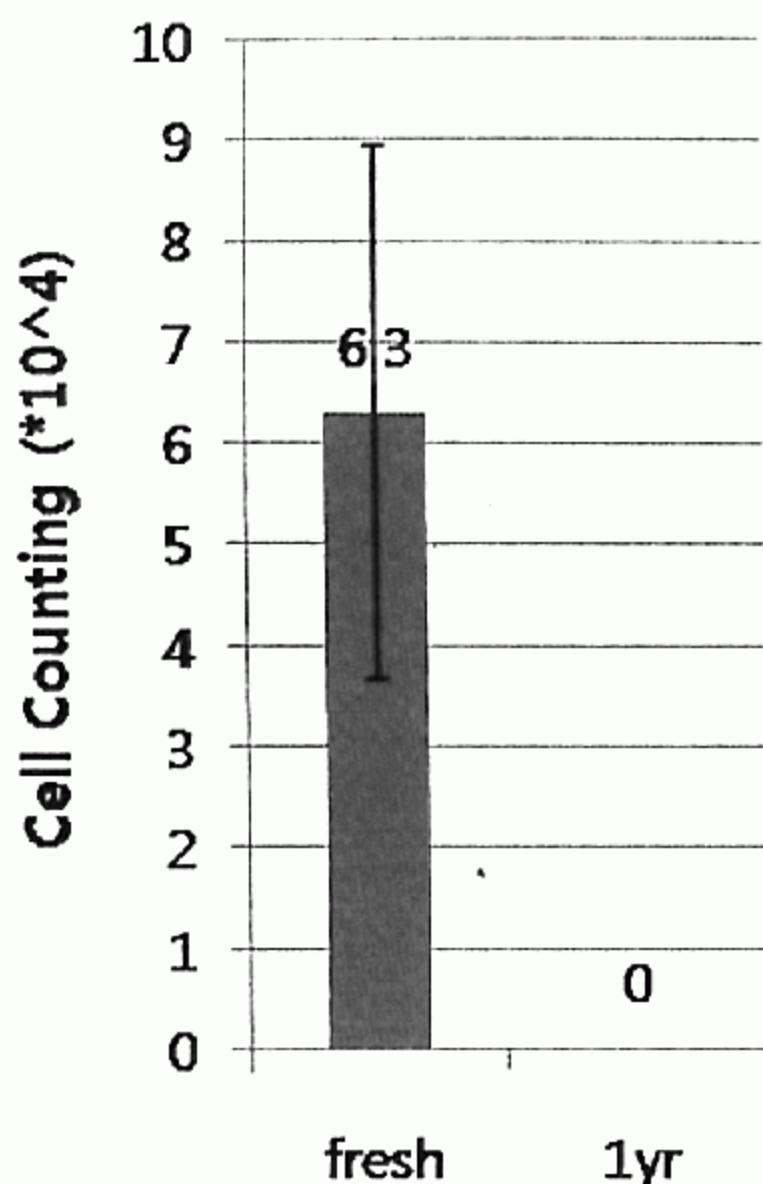
1년 이상 냉동 보관되었던 지방을 3주간 배양하였을 때



**Fig. 3.** Viability of mature adipocytes in fresh and 1 year cryopreserved specimens.



**Fig. 4.** Intracellular GPDH activity in fresh and 1 year cryopreserved lipoaspirates.



**Fig. 5.** Preadipocytes were isolated from fresh and 1 year cryopreserved lipoaspirates and cultured for 6 days. There was no attached cell even after 3 weeks culture in cryopreserved site culture flasks.

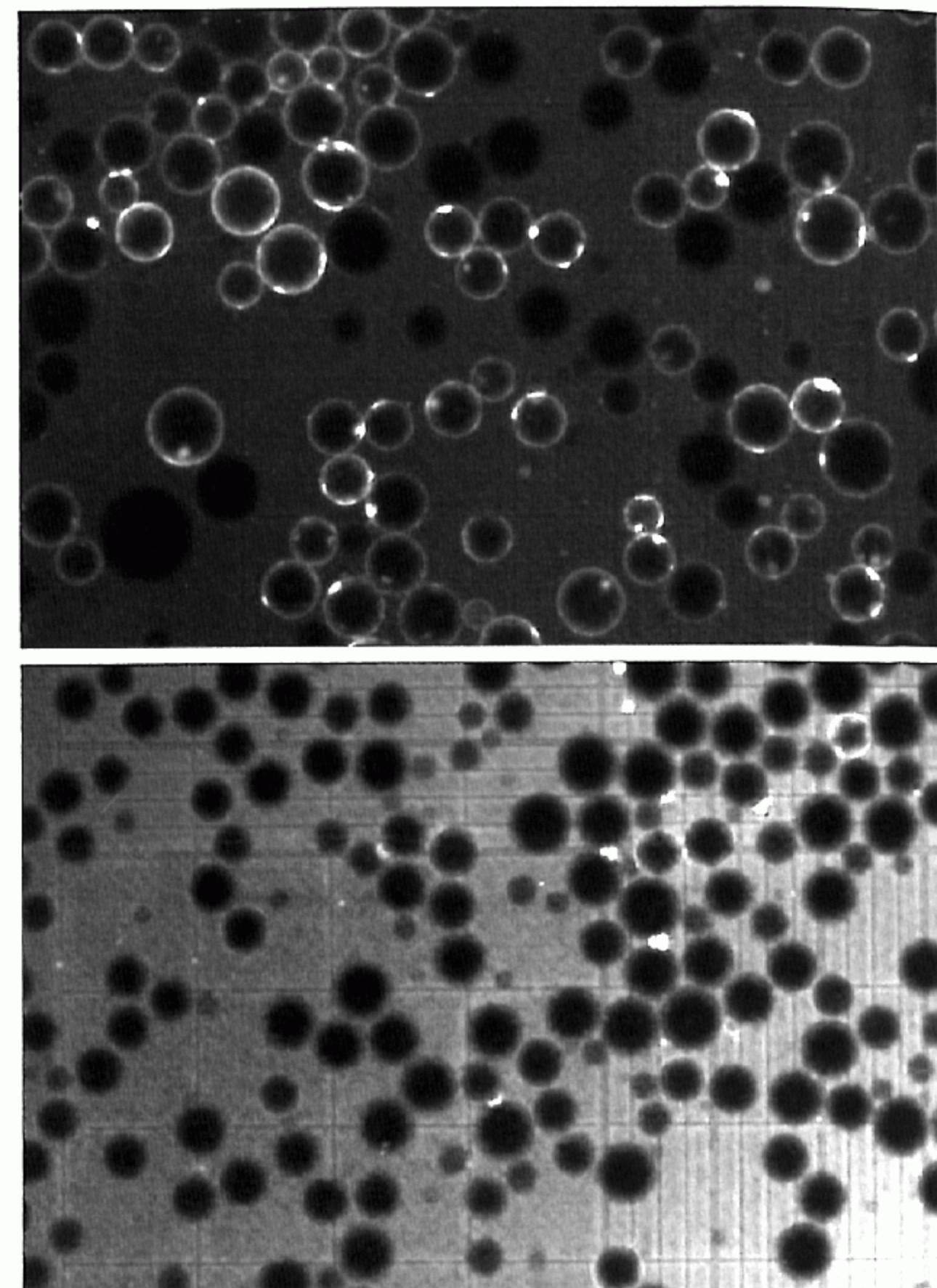
배양용기의 바닥에 부착하는 세포는 없었다. 그러나 신선한 지방을 6일간 배양하였을 때 평균  $6.3 \times 10^4/\text{mL}$ 개의 세포가 배양되었다(Fig. 5).

#### IV. 고 찰

지방세포의 생존을 실험실에서 정확하게 측정하는 것은 쉬운 일이 아니다. 왜냐하면 성숙한 지방세포는 더 이상 증식하지 않고 배양하여도 바닥에 붙지 않기 때문에 섬유모세포(fibroblast)나 지방전구세포(preadipocytes)와 같이 증식을 이용한 측정방법을 적용할 수 없기 때문이다.<sup>12</sup> 이와 같은 이유로 기존의 연구자들은 성숙한 지방세포를 trypan blue 등으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였는데,<sup>8</sup> 세포의 생존을 염색정도와 모양으로만 구별하기 위해서는 많은 경험이 요구되고 심지어 핵이 없거나 미토콘드리아의 활성이 없어도 모양은 정상으로 보이기 때문에 살아 있는 세포로 오인할 가능성이 많다. 이와 같은 실험 방법상의 오류가 저자들마다 상당히 다른 결과를 보고하게 된 이유 중의 하나로 짐작할 수 있다.

세포의 생존을 확인하는 방법은 크게 cell membrane integrity assay와 functional assay로 나눌 수 있다. Trypan blue stain, FDA/PI stain, GPDH assay 등은 전자에 MTT, XTT assay, acid phosphatase assay 등은 후자에 속한다. 이러한 세포 생존 확인 방법을 최근에야 지방세포의 생존 여부를 관찰하는 데 이용하게 되었다.<sup>9,13</sup>

FDA/PI 형광염색은 살아있는 세포에서는 fluorescein



**Fig. 6.** Comparison with FDA-PI staining of mature adipocytes from fresh specimen(Above) or preserved at -20°C for 3 days(Below). Note many live cells in the fresh sample and few live cells in the cryopreserved sample.

diacetate가 비특이적 esterase에 의해서 fluorescein으로 바뀌어 세포내에 축적되어 형광현미경 하에서 초록색을 띠게 되고, 세포막이 파괴된 세포에서만 propidium acetate가 세포내로 들어가 핵에 삽입되어 형광현미경하에서 핵이 붉은색을 띠게 되기 때문에 세포의 생존을 정확하게 구별할 수 있는 장점이 있다(Fig. 1).

GPDH 효소측정도 마찬가지로 정상에서는 세포내에 존재하는 효소가 세포막이 손상되어 세포외로 누출되는 것을 이용한 cell membrane integrity 분석의 하나이다. Wolter 등<sup>9</sup>의 연구에 의하면 -80°C에서 -20°C보다 세포의 파괴가 더 많고, 즉 세포의 GPDH가 더 높고, 일단 살아남은 세포는 더 잘 보존된다고 하였다. 저자들의 실험결과 흡광도는 0으로, 효소의 활성도는 없는 것으로 나타났다. 이것은 1년 이상 보관하였을 때 세포 내, 외의 모든 효소의 대사활성도는 100% 상실된다는 의미로 해석된다.

냉동 보관으로 인한 세포손상의 기전은 세포내 ice formation과 osmotic stress의 두 기전으로 보통 설명하는데, -20°C에서는 세포가 일부분만 얼기 때문에 대사가 아직

남아 있다고 한다.<sup>10</sup> 세포대사를 완전히 멈추게 하기 위해서는 -130°C가 되어야 하는데 이러한 온도로 내리고 유지하기 위해서는 많은 설비가 필요하고 오히려 세포에 금(crack)이 갈 수 있기 때문에 보통 -80°C에 조직을 보관하고 있다.<sup>9</sup> 최근 Matsumoto 등<sup>14</sup>은 매 15분마다 1°C씩 하강하게 하여 -80°C에 1개월간 보관한 지방에서 줄기세포 획득률이 신선지방에 비해 현저하게 줄어드는 것을 보고하였다.

냉동 보관한 지방이 얼마나 빨리 죽는지는 아직 알 수 없다. 그러나 MacRae 등<sup>15</sup>과 Wolter 등<sup>9</sup>의 연구들을 보면 -20°C에서 2일째에 급격하게 저하된다고 하였는데, 이들의 첫 분석 시점이 2일 이었기 때문에 첫 24시간에는 어떠했는지 알 수 없다. Matsumoto 등<sup>14</sup>은 지방을 실온에 보관하였을 때 첫 24시간에 현저하게 파괴되며, 4°C에 보관하였을 때 첫 48시간 이후에는 줄기세포 획득률이 신선지방에 비해 현저하게 줄어든다고 하였다. 저자들은 신선한 지방에서 성숙한 지방세포를 관찰하였을 때 약 80% 정도 생존하며, 하루가 지나면 약 13%로 급격하게 저하되는 것(미공개 자료)을 관찰하였다(Fig. 6). 이러한 보고들과 저자들의 결과를 종합하면 흡인지방은 보관 초기에 조금이라도 손상받은 성숙한 지방세포들은 대부분 죽는다고 볼 수 있다. 그러므로 흡인지방을 생존한 상태로 잘 유지하기 위해서는 단순히 얼려 놓는 것이 아니라, 적절한 cryoprotective agent(CPA)와 함께 사용하여야 하며, 인체에 무해하고 임상에서도 쉽게 이용할 수 있는 방법을 더 연구해야 할 것이다.

## V. 결 론

성인 18명을 대상으로 흡인지방을 -20°C에서 1년 이상 보관한 지방세포의 생존을 조사하였다. FDA/PI 형광염색으로 살아있는 지방세포의 수를 측정하고, GPDH 활성도와 세포배양을 시행하였다. GPDH 측정에서 세포의 활성도는 관찰되지 않았고 배양에서도 자라는 세포를 관찰할 수 없었다. 지방이식 시 -20°C에서 1년 이상 보관한 시료를 재이용하는 것은 의미가 없을 것으로 생각되며, 지방의 손쉬운 장기보관 방법과 시간이 지남에 따른 생존에 대한 연구가 계속되어야 하겠다.

## REFERENCES

- Scarborough DA, Schuen W, Bisaccia E: Fat transfer for aging skin: technique for rhytids. *J Dermatol Surg Oncol* 16: 651, 1990
- Pereira LH, Radwanski HN: Fat grafting of the buttocks and lower limbs. *Aesthetic Plastic Surg* 20: 409, 1996
- Guerrerosantos J, Gonzalez-Mendoza A, Masmela Y, Gonzalez MA, Deos M, Diaz P: Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats. *Aesthetic Plast Surg* 20: 403, 1996
- Moore JH Jr, Kolaczynski JW, Morales LM, Considine RV, Pietrzkowski Z, Noto PF, Caro JF: Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plast Surg* 19: 335, 1995
- 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
- Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D: The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: a comprehensive study. *Ann Plast Surg* 54: 288, 2005
- Schuller-Petrovic S: Improving the aesthetic aspect of soft tissue defects on the face using autologous fat transplantation. *Facial Plast Surg* 13: 119, 1997
- Sommer B, Sattler G: Current concept of fat graft survival: histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. *Dermatol Surg* 26: 1159, 2000
- Wolter TP, von Heimburg D, Stoffels I, Groeger A, Pallua N: Cryopreservation of mature human adipocytes: *in vitro* measurement of viability. *Ann Plast Surg* 55: 408, 2005
- Liu J, Woods EJ, Agca Y, Critser ES, Critser JK: Cryobiology of rat embryos II: a theoretical model for the development of interrupted slow freezing procedure. *Biol Reprod* 63: 1303, 2000
- Tchoukalova YD, Harteneck DA, Karwoski RA, Tarara J, Jensen MD: A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *J Lipid Res* 44: 1795, 2003
- von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kühling H, Schoof H, Hafemann B, Pallua N: Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials* 22: 429, 2001
- 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
- Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Inoue K, Suga H, Kato H, Aoi N, Murase S, Gonda K, Yoshimura K: Influence of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast Reconstr Surg* 120: 1510, 2007
- MacRae JW, Tholpady SS, Ogle RC, Morgan RF: *Ex vivo* fat graft preservation; Effects and implications of cryopreservation. *Ann Plast Surg* 52: 281, 2004