

인체 지방조직유래 줄기세포의
국소주사 및 이의 투여시기가
가토이개의 복합조직 이식의
생존율에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

김 채 민

인체 지방조직유래 줄기세포의
국소주사 및 이의 투여시기가
가토이개의 복합조직 이식의
생존율에 미치는 영향

지도교수 유 대 현

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014년 12월

연세대학교 대학원

의 학 과

김 채 민

김채민 의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 유 대 현 인

심사위원 노 태 석 인

심사위원 고 윤 우 인

연세대학교 대학원

2014 년 12 월

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 따뜻한 관심과 배려로 지도해주시고 격려해주신 유대현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 논문 심사과정에서 아낌없는 지도로 많은 가르침을 주신 노태석 교수님, 고윤우 교수님, 김영석 교수님께도 감사 드립니다. 실험 과정에서 가장 많은 도움을 주신 강은혜 연구원과 논문 교정에 도움을 주신 전여름 선생님께도 감사 드립니다. 그리고 성형외과 전공의 기간 많은 가르침을 주신 모든 은사님들께도 감사의 뜻을 전합니다. 아울러 함께 4년을 동고동락했던 김홍열, 민장환, 양채은, 백우열, 윤형우 선생님에게도 고맙다는 말씀을 전하고 싶습니다.

지금까지 늘 사랑과 관심으로 보살피 주신 부모님께 감사 드리며, 물심양면으로 저에게 힘이 되어주시는 장모님, 장인어른, 사랑하는 아내와 딸 수민이와 이 기쁨을 같이 나누고 싶습니다.

2014년 12월 저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 실험동물 및 실험일정	6
2. ASCs의 분리 및 배양	8
3. 수술 방법	10
4. 결과 측정	
가. 복합조직이식의 생존 면적	11
나. 레이저도플러를 이용한 미세혈류측정	11
다. 면역조직화학염색	12
라. 통계분석	12
III. 결과	13
1. 생존면적	13
2. 미세혈류	16
3. 신생혈관형성 (CD31)	17
4. VEGF	19
IV. 고찰	21
V. 결론	27
참고문헌	28
Abstract	32

그림 차례

그림 1. ASCs 투여 시기 및 수술일정	7
그림 2. 연골 피부 복합조직 이식의 수술방법	10
그림 3. 시간 경과에 따른 복합조직 이식의 생존 면적 변화	14
그림 4. 각 군별 생존 면적의 차이	15
그림 5. 시간경과에 따른 미세혈류량의 변화	16
그림 6. CD31 면역염색결과 (x400)	17
그림 7. 각 군별 신생혈관 개수의 차이	18
그림 6. VEGF 염색결과 (x400)	19
그림 7. 각 군별 VEGF 염색 결과의 차이	20

<국문요약>

인체 지방조직유래 줄기세포의 국소주사 및 이의 투여시기가
가토이개의 복합조직 이식의 생존율에 미치는 영향

복합조직 이식은 안면부 재건 시 많이 사용되는 술기 중에 하나로 술기가 비교적 간단하고, 색과 질감을 맞추기 용이하며 공여부의 장애가 적다는 장점이 있다. 그러나 조직의 생착 결과를 확신할 수 없고 특히 결손의 크기가 클 경우 중앙부위가 괴사된다는 문제점이 있다.¹ 따라서 복합조직 이식의 생존을 높일 수 있는 많은 방법들이 연구되고 있다. 지방조직유래 줄기세포 (Adipose derived stem cell, ASCs)는 주변 분비 작용을 통해 주변환경과 상호 작용하며 여러 성장인자를 분비하여 신생혈관 생성을 증가시키고 염증 반응을 감소시켜 임의 피판 및 지방이식의 생존율을 높이는 것으로 알려져 있다.^{2, 3} 따라서 본 연구는 ASCs 가 복합조직이식편의 생존율에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며, 투여시기에 따른 생존율의 차이를 연구하여 최적의 투여시기를 확인하고자 하였다. 총 15 마리의 뉴질랜드 흰 가토의 양측 귀에 2cm 직경의 원형

연골피부 복합조직을 거상하여 이를 90 도 회전시킨 후 재 이식하여 실험을 진행하였다. 총 30 개의 가토 귀를 임의로 세 그룹으로 나누어 실험군 1 과 실험군 2 는 각각 ASCs 2×10^6 /1ml 를 수술 7 일전, 수술 직전 이식편 주변에 피하주사 하였으며 대조군(control) 에는 PBS (Phosphate buffered saline) 1ml 를 같은 방법으로 피하주사 하였다. 수술 후 1, 3, 6, 9, 12 일에 촬영한 디지털 사진 분석을 통해 생존면적을 계산하였고, 레이저 도플러를 이용하여 이식편의 혈류량을 측정하였다. 수술 후 12 일째 조직을 채취하여 CD31 및 VEGF 면역염색을 시행하였다. 실험 결과, 복합조직의 생존율은 투여시점에 관계없이 ASCs 를 투여한 두 실험군 모두에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.05$), 신생혈관 형성(CD31)과 VEGF 의 발현량 또한 ASCs 를 투여하였을 때 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 그러나 투여 시점을 비교한 두 실험군 간의 이식편 생존율, 신생혈관 형성(CD31), 미세혈류량에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

핵심 되는 말 : 인체 유래 지방 줄기 세포, 복합 조직 이식

인체 지방조직유래 줄기세포의 국소주사 및 이의 투여시기가
가토이개의 복합조직 이식의 생존율에 미치는 영향

<지도교수 유 대 현>

연세대학교 대학원 의학과

김 채 민

I. 서론

선천적이거나 후천적인 다양한 원인에 의한 신체적 결손 혹은 변형을 재건하여 정상적인 기능과 외모를 갖추도록 하는 것은 성형외과의 가장 기본 된 목표이다. 따라서 일차봉합, 전층 혹은 부분층 피부이식, 국소 피관, 유리 피관, 복합조직 이식 등 다양한 방법을 이용한 결손의 수복 및 변형의 재건 시 기능적인 면 뿐만 아니라 미용적인 측면을 고려하여 수술방법을 결정해야 한다. 따라서 재건 방법을 고려할 때도 결손 부위의 크기, 창상의 위축 정도, 색, 질감, 공여부의 장애 등을 모두 고려하여 수술방법을 결정해야 한다.

많은 기법 중 복합조직 이식은 여러 장점을 가지고 있는 유용한 수술법 중에 하나이다.⁴ 복합 조직 이식은 피부 이식술에 비해 수술 후 발생하는 색과 질감의 차이가 적고, 수술 후 구축이 적으며 두 가지 이상의 조직을 동시에 이식할 수 있어 조직의 형태를 유지하고 지지해 줄 수 있다. 예를 들어, 연골피부 복합조직과 같이 연골을 포함시킨 복합 조직 이식의 경우 귀나 코의 재건 시 삼차원적인 구조를 유지한 재건이 가능하다는 장점이 있다.⁵ 그러나 복합 조직 이식은 결손 부위가 1.5cm보다 클 경우 이식한 조직의 생존율이 떨어져 최종 결과를 예상하기 어렵다는 단점이 있다.¹ 이러한 이유로 복합조직 이식 시 생존율을 높일 수 있는 많은 방법들이 연구되어 왔다. 현재까지 복합조직 이식의 생존율을 높이기 위한 방법으로 ice-cold compression, steroid injection, hyperbaric oxygen therapy, FGF injection, platelet rich plasma injection 등이 보고되어 왔다.^{6,7}

지방조직유래 줄기세포(Adipose derived stem cell, ASCs)는 주변분비작용 (paracrine activity)을 통하여 VEGF, HGF를 비롯한 다양한 성장인자를 발현시키며, angiogenic potential을 가져 신생혈관 형성을 도와 임의 피관 및 지방이식의 생존율을 높이는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹⁰ 또한 ASCs가 발현시키는 VEGF의 양이 적용 1주 후 가장 높게 발현된다는 임의 피관 모델을 이용한 연구결과와, 임의

피판 수술 전 ASCs를 전처치 하는 것이 피판의 생존에 도움이 된다는 연구결과를 통해 ASCs의 투여시기가 피판의 생존에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있게 되었고, ^{11 12} 이를 ASCs를 복합조직 이식에 적용하여 보기로 하였다.

따라서 저자는 본 연구를 통해 ASCs가 복합조직 이식편의 생존율에 미치는 영향을 확인하고, 또한 최대의 효과를 얻을 수 있는 적절한 투여 시기를 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험일정

총 15 마리의 뉴질랜드 흰 가토의 양쪽 귀에 거상한 직경 2cm 직경의 원형 연골피부 복합조직 모델을 이용해 실험을 진행하였다.⁷ 실험 동물은 연세의대 동물실험실에서 사육되었고, 모든 실험 과정은 동물실험실의 윤리기준과 사육규정을 준수하였다.

총 30 개의 연골피부 복합조직 모델을 임의로 10 개씩 세 그룹으로 나누었다. 실험군 1 은 2×10^6 개의 ASCs 를 PBS (Phosphate buffered saline) 1ml 에 mix 하여 1ml 주사기를 이용해 수술 7 일전 수술예정인 원형 피판으로부터 0.5cm 떨어진 곳에 상하좌우 네 곳에 골고루 피하주사 하였으며, 실험군 2 는 실험군 1 과 모든 조건을 동일하게 진행하되 ASCs 를 연골피부 복합조직을 거상하기 직전에 투여하였다. 대조군(control)은 PBS 1ml 를 같은 방법으로 주사하였다.

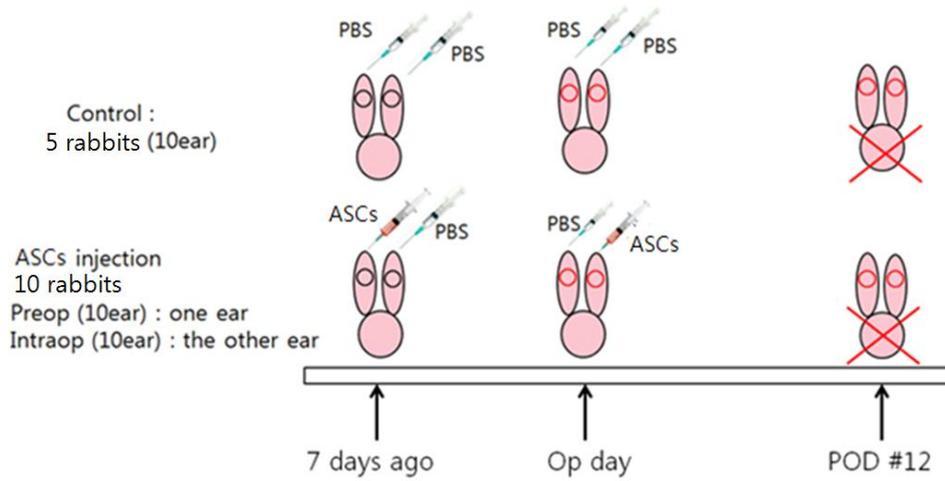


그림 1. ASCs 투여 시기 및 수술일정. 수술 7 일전 실험군 1 에는 ASCs 를 투여하고 대조군과 실험군 2 에는 PBS 를 투여한다. 수술 직전 실험군 2 에는 ASCs 를 투여하고 대조군과 실험군 1 에는 PBS 를 투여한다. 수술 후 12 일째 가토를 희생하여 조직검사를 시행하였다.

2. ASCs 의 분리 및 배양

지방조직 흡입술 (liposuction)을 시행 예정인 기증자로부터 지방 조직에 대한 연구용 목적의 사용 동의를 얻은 후 복부에서 Liposuction syringe 를 이용한 지방흡입 방법(Coleman's method)으로 지방을 채취 하여 기존의 알려진 방법을 이용해 ASCs 를 분리 하였다.

ASCs 분리 방법을 간단히 요약하면 다음과 같다. 획득한 인체지방조직을 실험실 환경에서 지방 10g 당 0.1% collagenase (Wako, Osaka, Japan)/ PBS 용액 20ml 를 적용하여 37°C shaking incubator 에서 60 분간 처치한다. collagenase activity 를 억제시키기 위해 collagenase 용액과 동량의 4°C의 배지(DMEM/F12 (Invitrogen, Grand Island, NY), 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, Utah) and 1% penicillin-streptomycin solution (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany))를 적용시킨다. 이를 원심 분리 (1200G/25°C/10min) 하여 하층의 stromal-vascular fraction (SVF) 을 취득한 후, 이를 배지와 섞어서 75T 플라스크 (Corning, Corning, NY) 에 도포한 후 2 일간 37.3°C, 5% CO₂ incubator 에 배양한다. 2일 뒤 배양 접시에 부착된 세포만 남기고 PBS로 세척해 미부착 세포를 제거하였다. 이후 3 일마다 배지를 교환하며 배양된

세포가 밀집상태 (confluent state)에 도달하면 0.25% trypsin (Gibco, NY, USA)용액으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다. 본 실험에서는 4 회 계대 배양 한 지방유래 줄기세포를 사용하였다.

3. 수술 방법

평균 3kg 의 뉴질랜드 흰 가토 15 마리의 양측 이개부에 연골피부 복합조직 이식을 시행하였다.⁷ 수술 전날, 모든 토끼들은 금식을 시행하였다. Zoletil 50 (Virbac, Carros, France) 과 2% Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany) (1 : 2 ratio, 1 mL/kg) 용액을 근육 주사하여 전신 마취를 시행하였다. 수술 부위는 povidone-iodine solution 을 이용하여 소독을 시행 후, 귓구멍으로부터 4cm 떨어진 곳에 2cm 직경의 원형 전층 연골피부 복합조직을 도식하였다. 피부와 이개 연골을 포함한 전층 연골피부 복합 조직판을 거상한 후 반시계 방향으로 90° 회전시켜 6-0 Nylon 을 이용해 봉합해주었다 (그림 2).

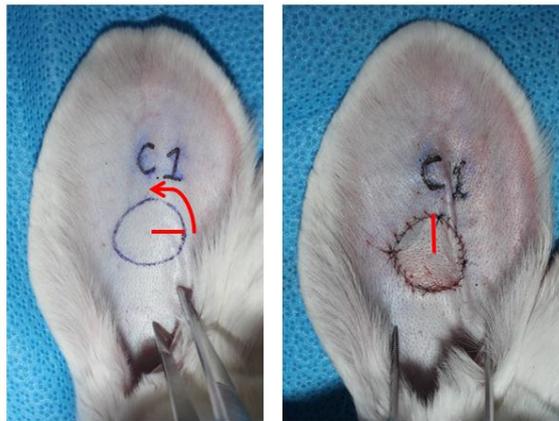


그림 2. 연골피부 복합조직 이식의 수술방법

4. 결과 측정

가. 복합조직이식의 생존 면적

수술 후 0, 1, 3, 6, 9, 12 일째 이식부위를 동일 거리와 조건에서 디지털 카메라 (EOS 600D, Canon, Tokyo, Japan)로 촬영한 후 두 명의 연구자가 Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA) 영상 분석 프로그램을 이용하여 생존 면적을 계산 후 두 연구자의 평균값으로 각 군을 비교하였다.

나. 레이저도플러를 이용한 미세혈류측정

시간에 따른 혈류의 변화를 측정하기 위해 레이저도플러 (Peri-Flux System 5000; Perimed, Inc., Stockholm, Sweden) 장비를 이용해 혈류량을 측정하였다.¹³ 수술 전과 수술 후 1, 3, 6, 9, 12 일째 이식편 표면의 서로 다른 4 개의 지점에서 1 분간 측정을 시행하였고, 측정결과는 perisoft program (Perimed, Inc., Stockholm, Sweden)을 이용해 분석하였다.

다. 면역조직화학염색

수술 후 12 일째 토끼를 안락사 시킨 후 이식편을 채취하여 파라핀에 묻은(paraffin embedding)후 각 절편을 슬라이드로 제작하였다. 이후 anti-VEGF monoclonal antibody (ab1316, abcam, MA, USA)와 CD-31 antibody (anti-mouse platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM/CD31) polyclonal antibody; ab9498, abcam, MA, USA) 면역염색을 시행하였다. VEGF 면역염색 결과는 Metamorph image analysis software (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) 를 이용하여 반정량 측정 (Semi-quantitative analysis) 하였으며, CD31 에 염색된 내피혈관 세포는 광학현미경을 이용하여 두 명의 연구자가 400 배율로 관찰하여 신생혈관형성 (Neovascularization)의 수를 측정하였다.

라. 통계 방법

통계 분석 프로그램으로 Graphpad Prism5 (Graphpad software, CA, USA)를 이용하였다. 모든 분석은 ANOVA test를 이용하여 검정하였고, ANOVA test에서 유의성이 인정되면 Bonferroni test를 하여 $p < 0.05$ 인 것을 통계적으로 유의 하다고 평가하였다.

III. 결과

1. 생존 면적

시간이 경과함에 따라 괴사된 피부조직을 관찰 할 수 있었으며, 주변부의 조직보다 가운데 부분에서 주로 괴사가 발생하는 양상이었다 (그림 3.).

전체 복합조직이식편의 면적 대비 생존한 조직의 면적은 실험군1에서 68.1% (± 9.6), 실험군2 에서 65.4% (± 6.2), 대조군에서 46.83% (± 13.4) 으로 ASCs를 투여했던 실험군 1과 실험군2 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 생존면적이 증가함을 보였다 ($p < 0.05$). 그러나 ASCs투여 시기에 따른 생존면적의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 (그림 4.).

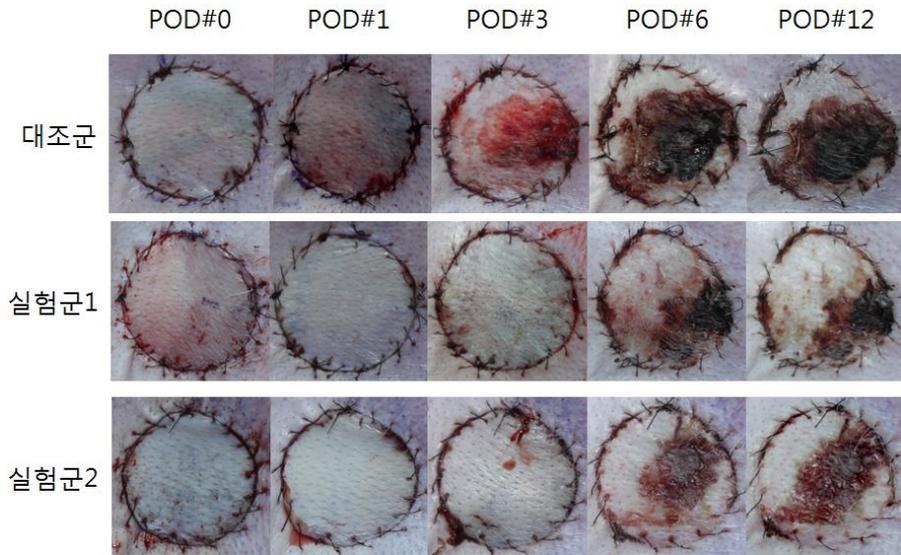


그림 3. 시간 경과에 따른 복합조직 이식의 생존 면적 변화 : 시간이 경과함에 따라 중앙부에 괴사된 피부 조직을 관찰할 수 있었으며 ASCs 를 투여한 실험군에서 대조군보다 생존면적이 넓게 나타났다 ($p < 0.05$).

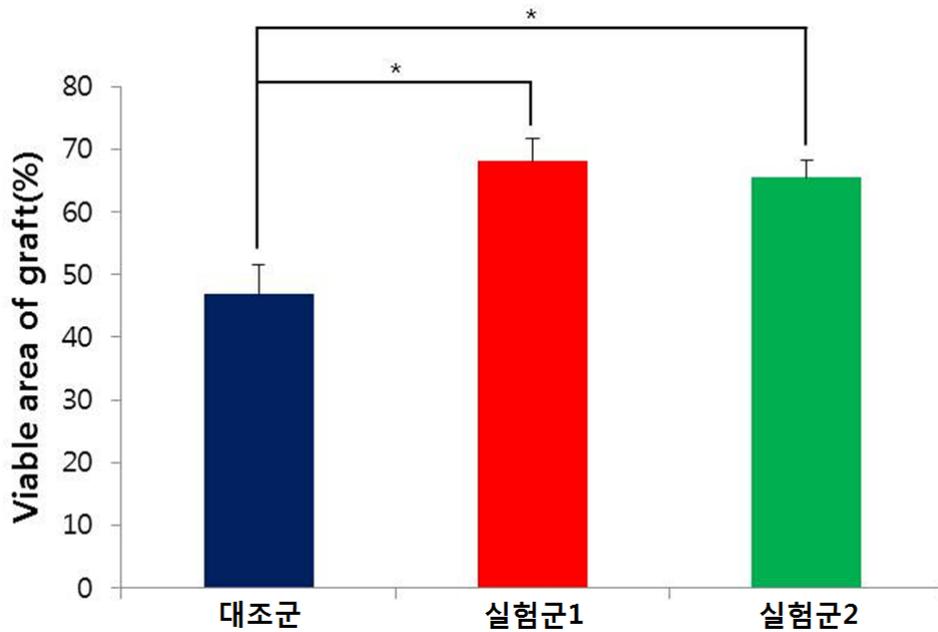


그림 4. 각 군별 생존 면적의 차이 : 각 군의 생존면적은 실험군 1 에서 68.06%, 실험군 2 에서 65.44%, 대조군에서 46.83%으로 ASCs 를 투여했던 실험군이 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 생존면적이 증가함을 보였다. (* $p < 0.05$) 그러나 투여시기에 따른 비교에서 실험군 1 과 실험군 2 간의 통계적 유의성은 없었다.

2. 미세혈류량

레이저 도플러를 이용하여 미세혈류량을 측정한 결과 수술 3 일째부터 ASCs 를 투여한 두 실험군 모두에서 대조군보다 평균 혈류량이 높은 경향을 보였고, 수술 후 3 일째 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 그러나 그 외에는 각 그룹간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 수술 후 12 일째 미세혈류량의 결과를 보면 대조군은 17.7 (± 4.8) 실험군 1 은 28.0 (± 9.8), 실험군 2 는 26.4 (± 9.81) 로 측정 되었다 (단위 : PU, Perfusion unit).

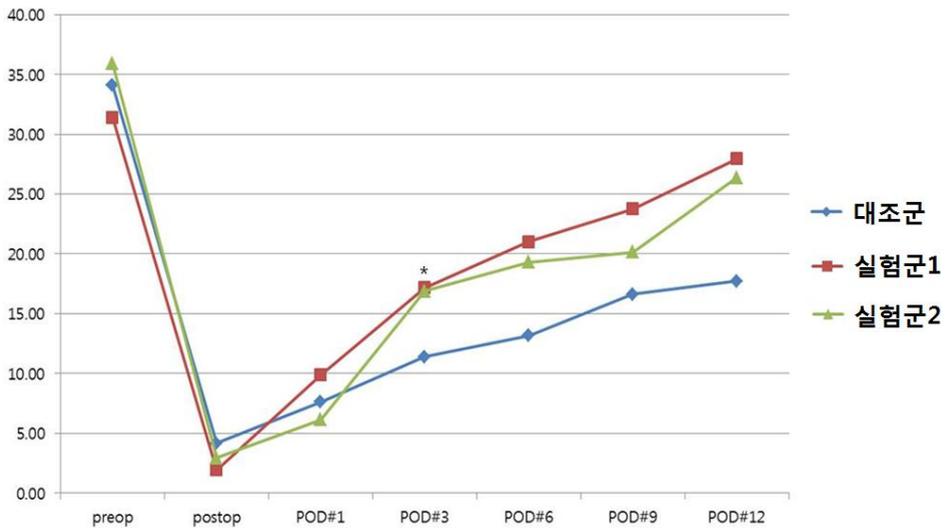


그림 5. 시간경과에 따른 미세혈류량의 변화 수술 후 3 일째 실험군에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 높은 미세혈류량을 보였다. (* $p < 0.05$)

3. 신생혈관형성 (CD31)

400배율에서 관찰한 신생혈관의 평균 개수는 대조군에서 2.2 (± 1.3)개, 실험군 1에서 6.9 (± 1.9)개, 실험군 2에서 6.3 (± 2.1)개로 확인되었다(그림 6). ASCs를 처치한 실험군 1과 실험군 2는 모두 대조군과 비교했을 때 통계적으로 의미있는 증가양상을 보였으나, ASCs의 적용시기에 따른 차이는 통계적으로 의미가 없었다(그림 7).

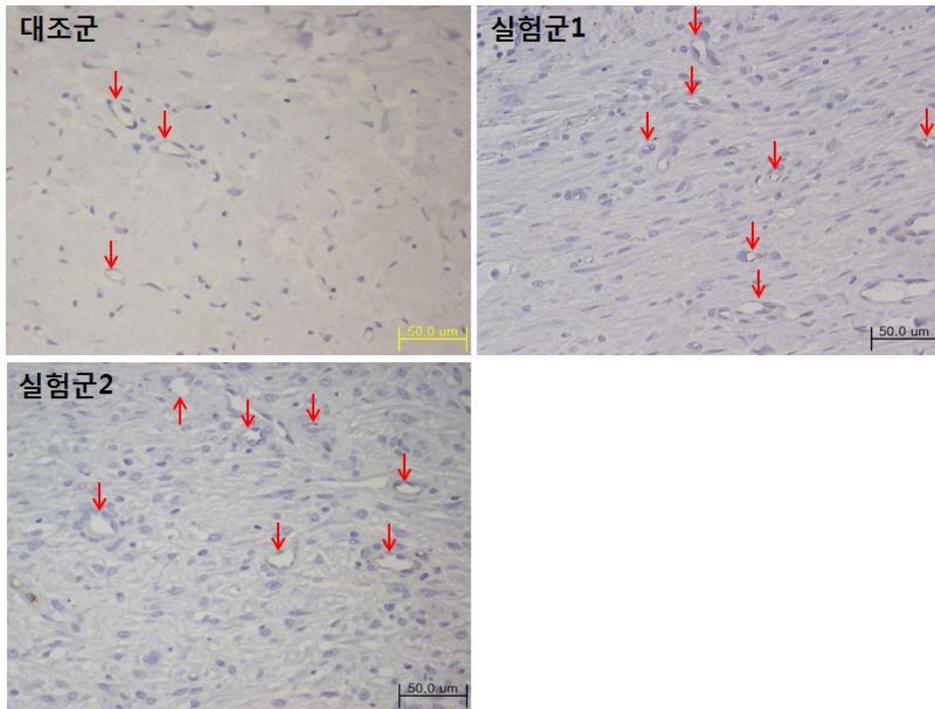


그림 6. CD31 면역염색 결과 (x400) 신생혈관의 평균 개수는 대조군 2.2 개 실험군 1은 6.9 개 실험군 2는 6.3 개로 확인되었다. (적색 화살표는 계수한 신생혈관을 표시)

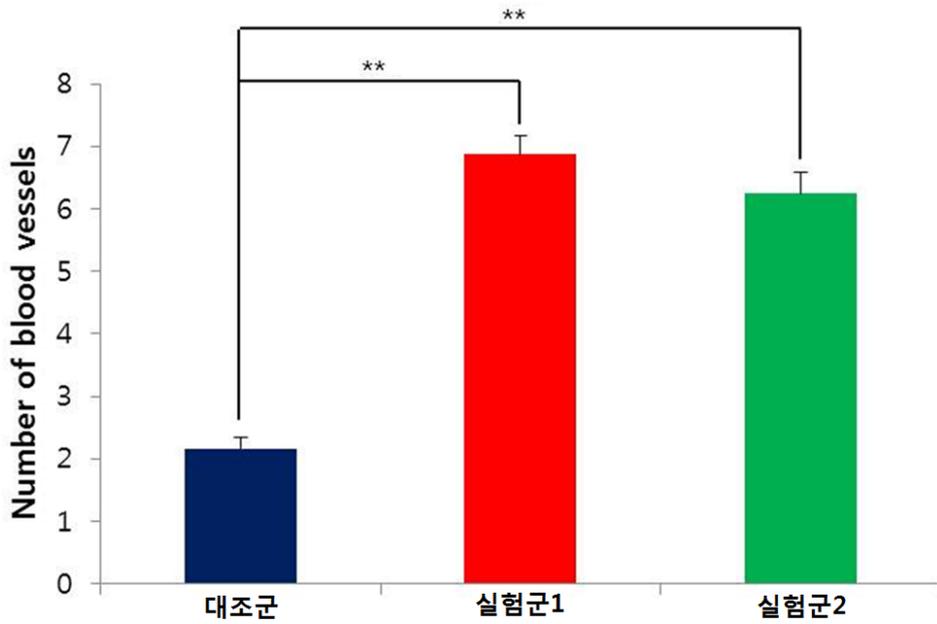


그림 7. 각 군별 신생혈관 개수의 차이 실험군은 두군 모두 대조군보다 신생혈관 개수가 통계적으로 높게 나타났다. (** $p < 0.01$) 투여 시기에 따른 비교에서 실험군 1 과 실험군 2 의 신생혈관의 수는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

4. VEGF

VEGF의 양은 ASCs를 투여했던 실험군1과 실험군2가 대조군보다 높게 나타났다(그림 8,9).

수술 직전에 ASCs를 투여한 실험군2가 가장 높게 나타났고, 다음으로 수술 일주일 전에 ASCs를 투여한 실험군1, PBS만 투여한 대조군 순으로 나타났다. 각 군의 차이를 검정한 결과 각각 모두 유의한 차이를 나타내었다 ($p < 0.01$).

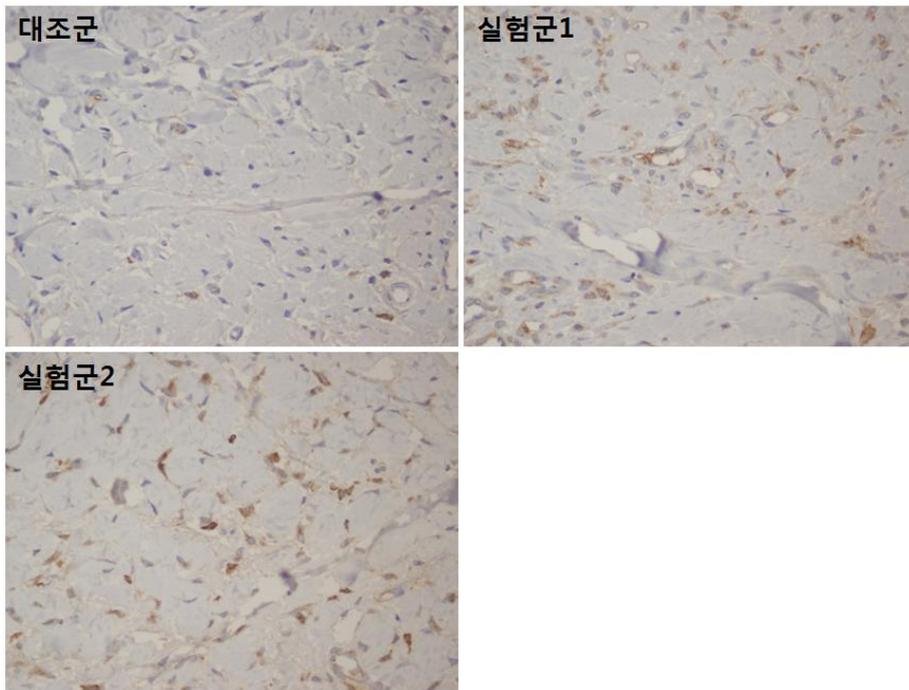


그림 8. VEGF 염색결과 (x400) anti-VEGF monoclonal antibody 로 면역염색을 시행하였다. 갈색으로 염색된 부분이 VEGF 가 염색된 것으로 실험군에서 높게 확인된다.

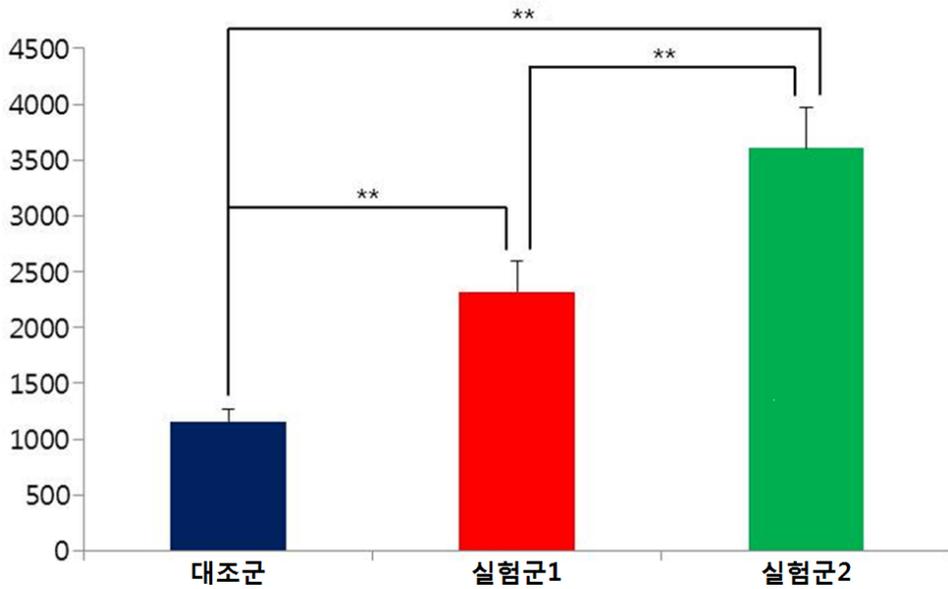


그림 9. 각 군별 VEGF 염색 결과의 차이 면역 조직 화학 염색된 400 배 표본에서 반정량 측정을 시행하였다. ASCs 를 투여한 실험군 1 과 실험군 2 는 대조군보다 VEGF 수치가 높게 나타났고, 투여 시점에 대해서는 수술직전 ASCs 를 투여한 실험군 2 가 7일전 ASCs 를 투여한 실험군 1 보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다(** $p < 0.01$).

IV. 고찰

창상의 치유과정은 복잡하고 다양한 cytokine, growth factor, chemokine 들이 분비되는 것에 의해 이루어진다. 줄기세포는 다양한 인자들을 분비하고 주변 분비능 (paracrine effect)을 가져 주변과 상호작용하는 성질이 있어 이를 창상치유에 적용하려는 노력이 계속해서 이루어져왔다.¹⁴ 손상된 조직에 줄기세포를 외부에서 투여했을 경우 치료적인 효과가 있다는 것은 다양한 동물 실험을 통해 증명되었고,^{10, 15} 사람을 대상으로 시행한 연구에서도 치료되지 않는 만성 창상에 대한 효과가 보고 된 바 있다.^{16, 17}

줄기세포는 epidermal keratinocyte, endothelial cell, pericyte 로 분화되어 구조적인 재생에 직접적으로 역할을 하기도 하지만 주로 주변분비 (paracrine effect) 능력을 통해 fibroblast growth factors, vascular endothelial growth factor 와 같은 다양한 성장 인자들을 분비하고, 이러한 인자를 통한 혈관형성 (angiogenesis), 섬유세포 증식 (fibroproliferation), 염증반응 조절 (inflammatory response)과 같은 국소적 세포반응을 유도해 창상 회복을 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{16, 18}

줄기세포는 골수, 체대혈, 지방조직 등에서 분리할 수 있고 각 조직에서 얻어진 줄기세포는 그 유래에 따라 표현형과 특성에 차이가

있다.^{19, 20} 그러나 제대혈 줄기세포는 채취에 한계가 있어 성인에게서는 골수유래줄기세포와 지방유래 줄기세포를 채취하여 임상적으로 적용하고 있고, 두 세포를 비교한 연구에서 두 세포간에 분화능력은 동등한 것으로 발표 되었다.²⁰ 지방 유래 줄기세포는 골수유래 줄기세포보다 채취가 덜 침습적이며 얻을 수 있는 양이 풍부하다는 장점을 가지고 있어 줄기세포 연구에서 가장 많이 사용되고 있다.²¹ 또한 ASCs는 면역 원성 (immunogenicity)이 약하여 동종이식이 (allograft)나 이종간 이식 (xenograft) 에서도 거부 반응 없이 생존하기 때문에 동물 실험 뿐만 아니라 임상응용에도 적합하다는 장점이 있다.^{3, 22}

이러한 이론적 배경을 바탕으로 본 연구에서는 안면부 재건에 유용한 방법이지만 생존율의 한계로 인해 크기의 제한이 있고 생존율 향상에 명확한 방법이 없는 복합조직 이식에서 ASCs가 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다. 또한 ASCs의 사전 투여 시 임의피판의 생존율이 높아졌다는 이전 연구결과를 토대로¹¹ 수술 전 ASCs를 투여하여 조직의 생착에 필요한 인자들을 미리 전처리 (preconditioning) 함으로써 신생혈관 형성 및 이식편의 생존에 미치는 영향을 조사해보려고 하였다.

실험 결과, ASCs를 투여한 실험군은 PBS만을 투여한 대조군보다 높은 생존율과 신생혈관 형성을 보였으나 투여시기에 따른 차이는

존재하지 않았다. 미세혈류량은 수술 후 3일째 ASCs를 투여한 실험군에서 높게 측정되었으나 그 이후에는 통계적 차이를 보이지 않았다.

ASCs를 투여한 실험군이 대조군에 비해 생존율과 신생혈관 형성이 높게 나타났으나 투여 시기와 무관한 결과를 보인 가장 큰 이유는 ASCs가 성장인자를 분비하도록 하는 자극이 부족하여 전처치의 최대효과를 나타내지 못했기 때문으로 생각된다.

ASCs는 저산소 상태 (hypoxia)와 같은 자극이 있을 때 VEGF나 bFGF와 같은 각종 성장 인자들의 분비를 촉진시켜 전처치 (preconditioning) 효과를 극대화 시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.^{11, 23} 그러나 임의 피판을 이용한 실험에서는 hypoxia를 유발시키지 않은 ASCs의 전처치 (preconditioning)만으로도 수술당일 투여했던 것 보다 통계적으로 유의하다는 기존의 연구결과가 있었고¹¹, 복합조직 이식에서는 지연 피판술(surgical delay procedure)을 이용한 hypoxia 유발이 불가능하여 ASCs 단독 투여만으로 실험을 진행하였다. 술자의 술기나 합병증의 여부가 생존율에 영향을 미칠 수 있으나 본 연구에서는 본 실험에서는 한 명의 숙련된 술자가 모든 수술을 시행하였으므로 수술적 완성도에는 차이가 적었다. 또한 연골 피부 복합조직 이식 시 발생하는 장액종과 혈종 등의 합병증도 각 군간에 발생의 차이는 없었다.

레이저 도플러를 이용한 미세혈류량 측정 결과 ASCs를 투여한 두 실험군 모두에서 대조군에 비해 혈류량 증가 경향을 보였으나 수술 후 3일째를 제외하고는 통계적 유의성은 없었다. 그 이유는 개체수가 각 군당 10개로 충분하지 않았고, 또한 개체마다 미세혈류량의 차이가 컸기 때문으로 생각해 볼 수 있다. 또한 ASCs의 전처치 효과가 수술 직후부터 나타날 것을 기대하였으나 수술 직후 각 군간에 미세혈류량에 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 ASCs가 전처치 되어 분비된 성장인자가 충분하지 않았고 투여된 ASCs의 주변분비 효과가 외부자극 (surgery)이 가해진 이후에 나타났기 때문으로 추측해 볼 수 있다. 그리고 수술 후 3일 이후부터 두 실험군 모두에서 미세혈류량이 비슷하게 나타난 것으로 보아 전처치된 ASCs의 작용과 수술직전 투여된 ASCs가 유사한 정도와 기전으로 복합조직 이식에 작용했다고 판단된다.

CD31 염색을 시행하였을 때 신생혈관 형성 개수의 차이는 실험군이 대조군보다 높게 나타났으나 투여시기에 따른 유의성은 없었다. 이 결과를 통해 ASCs가 신생혈관형성에도 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으나 ASCs의 전처치 효과는 크지 않았다는 것을 알 수 있었다. 이는 전처치된 ASCs가 성장인자들을 미리 분비해 놓았다기보다 투여된 상태로 조직 내에 생존해 있다가 외부자극이 주어진 이후에 성장인자를 분비했기 때문으로 생각해 볼

수 있다.

ASCs는 주변분비능력을 가져 VEGF등의 성장인자를 분비하여 신생혈관형성을 촉진 시키는 것으로 확인되어있고,⁸ 본 연구에서도 ASCs를 투여한 군이 대조군보다 VEGF가 통계적으로 의미 있게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 투여 시점에 따른 결과를 비교해보면 수술 전에 ASCs를 투여한 군보다 수술당일 ASCs를 투여한 군에서 VEGF가 더 높게 나타났다. 이는 ASCs의 VEGF 분비량이 시간의 흐름에 따라 변화하기 때문으로 생각되며, 수술 7일전 ASCs를 투여한 군의 경우 ASCs적용 시기부터 조직의 채취까지 19일이나 지났기 때문에 수술 직전 ASCs를 투여한 군에 비해 분비량이 감소하였을 가능성이 있다. 이는 in vitro 조건에서 ASCs의 VEGF 분비가 일주일째까지는 시간에 따라 증가하다가 이후 감소하는 양상을 보이는 이전 실험과 부합하는 결과이다.¹²

본 연구의 제한점으로는 첫째로 ASCs의 전신적인 영향을 고려하지 않았다는 점을 들 수 있다. ASCs는 국소적인 효과로 주변분비 효과를 나타내기도 하지만 정맥 주사 시에도 그 효과가 나타난다고 보고되어 있다. 따라서 ASCs의 전신효과를 배제하기 위해서는 독립된 개체를 대상으로 실험을 진행해야 보다 객관적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

둘째로 조직학적인 검사가 실험 마지막에만 시행 되었기 때문에

복합조직 이식과정 중간의 조직학적인 변화 및 VEGF 분비량의 변화를 확인하지 못하였다. 실제로 본 실험에서는 VEGF가 어느 시점에서 가장 높았는지, 조직학적 변화가 어떻게 진행 되었는지 알 수 없었다. 따라서 충분한 개체 수를 확보하여 시간 순서에 따른 조직학적 변화와 VEGF의 농도를 western blot이나 ELISA와 같은 보다 정량적인 방법으로 측정한다면 시간에 따른 VEGF분비량의 변화를 확인할 수 있을 것이다.

셋째로 투여 시점이 다양하지 못하여 최적의 투여시점에 대한 객관적 결과를 얻지 못하였다. 본 실험에서는 ASCs가 복합조직 이식의 생존율을 향상시킨다는 결과는 얻었으나, 두 실험군 간의 통계적인 차이를 보이지 못하였다. 따라서 향후 투여 시점을 다양화 하여 최적의 투여시점과 전처치 효과가 사라지는 시점에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

가토 이개의 복합 조직 이식 시 ASCs를 주변 조직에 피하주사 할 경우 실험 결과는 다음과 같았다.

1. 복합조직의 생존율은 ASCs를 투여하였을 때 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$).

2. 면역조직화학 검사상 신생혈관 형성(CD31)과 VEGF의 발현량은 ASCs를 투여하였을 때 의미있는 증가를 보였다 ($p < 0.05$).

3. ASCs를 술 전 일주일 전에 투여한 군 (실험군1)과 수술 당일 투여한 군 (실험군2) 사이에 생존율, 신생혈관 형성(CD31), 미세 혈류량에서 모두 통계적인 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서는 ASCs가 복합조직 이식의 생존율을 유의하게 증가시키며, 이는 투여시점과는 무관하다는 것을 실험적으로 확인하였다.

결론적으로 ASCs를 이식하는 조직의 주변에 피하 투여하는 것은 복합조직이식의 생존율을 증가시키는 보조적인 방법으로 사용될 수 있으며, 사전 투여 역시 효과가 있음을 보여주었다.

참고문헌

1. Jeon YR, Kang EH, Yang CE, Yun IS, Lee WJ, Lew DH. The effect of platelet-rich plasma on composite graft survival. *Plastic and reconstructive surgery* 2014;134(2):239-46.
2. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plastic and reconstructive surgery* 2010;126(6):1936-46.
3. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plastic and reconstructive surgery* 2012;129(6):1277-90.
4. Cheon YW, Park BY. Long-term evaluation of elongating columella using conchal composite graft in bilateral secondary cleft lip and nose deformity. *Plastic and reconstructive surgery* 2010;126(2):543-53.
5. Son D, Kwak M, Yun S, Yeo H, Kim J, Han K. Large auricular chondrocutaneous composite graft for nasal alar and columellar reconstruction. *Archives of plastic surgery* 2012;39(4):323-8.
6. Harbison JM, Kriet JD, Humphrey CD. Improving outcomes for composite grafts in nasal reconstruction. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 2012;20(4):267-73.
7. Li EN, Menon NG, Rodriguez ED, Norkunas M, Rosenthal

RE, Goldberg NH, et al. The effect of hyperbaric oxygen therapy on composite graft survival. *Annals of plastic surgery* 2004;53(2):141–5.

8. Rubina K, Kalinina N, Efimenko A, Lopatina T, Melikhova V, Tsokolaeva Z, et al. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue engineering Part A* 2009;15(8):2039–50.

9. Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 2010;63(11):1886–92.

10. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2008;121(1):50–8.

11. Yue Y, Zhang P, Liu D, Yang JF, Nie C, Yang D. Hypoxia preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg* 2013;37(1):159–70.

12. Lu F, Li J, Gao J, Ogawa R, Ou C, Yang B, et al. Improvement of the survival of human autologous fat

transplantation by using VEGF–transfected adipose–derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery* 2009;124(5):1437–46.

13. Choi CM, Bennett RG. Laser Dopplers to determine cutaneous blood flow. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]* 2003;29(3):272–80.

14. Ko SH, Nauta A, Wong V, Glotzbach J, Gurtner GC, Longaker MT. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plastic and reconstructive surgery* 2011;127 Suppl 1:10S–20S.

15. Nauta AC, Gurtner GC, Longaker MT. Adult stem cells in small animal wound healing models. *Methods in molecular biology* 2013;1037:81–98.

16. Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plastic and reconstructive surgery* 2010;125(2):510–6.

17. Hocking AM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. *Advances in wound care* 2012;1(4):166–71.

18. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS one* 2008;3(4):e1886.

19. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plastic and reconstructive surgery* 2010;126(4):1163–71.
20. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters* 2003;89(2–3):267–70.
21. Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem cells for hepatic regeneration: the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Current stem cell research & therapy* 2010;5(2):182–9.
22. Haddad–Mashadrizeh A, Bahrami AR, Matin MM, Edalatmanesh MA, Zomorodipour A, Gardaneh M, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells can survive and integrate into the adult rat eye following xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2013;20(3):165–76.
23. Oh JS, Ha Y, An SS, Khan M, Pennant WA, Kim HJ, et al. Hypoxia-preconditioned adipose tissue-derived mesenchymal stem cell increase the survival and gene expression of engineered neural stem cells in a spinal cord injury model. *Neuroscience letters* 2010;472(3):215–9.

ABSTRACT

The effect of injection time of human adipose derived stem
cell in the survival
of rabbit ear composite graft

Chae Min Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dae Hyun Lew)

Composite graft operation is a frequently used technique for facial reconstruction. The simplicity of operation technique, good color matching, and low donor site morbidity makes composite graft a favorable technique. However, the unpredictability of the results and the difficulty of operation

for large defect size are its weaknesses. Also, considerable time and cost are consumed when there is graft necrosis. For these reasons, there have been many studies to increase the survival rate of composite graft.

Adipose derived stem cell expresses many cytokines such as VEGF, HGF through paracrine activity and increases the survival of random flap and fat graft due to its angiogenic potential. Moreover, there have been reports that preoperative injection of adipose derived stem cell is helpful for the survival of random flap. However, there have been no studies considering the optimal injection time of adipose derived stem cell for composite graft. Therefore, this study is aimed to investigate the increase of survival rate of composite graft after the adipose derived stem cell injection, and to compare the effect of injection performed preoperatively and intraoperatively.

A 2 cm diameter circular shaped chondrocutaneous composite tissue from 15 New Zealand White rabbits were used for the study. 30 ears were divided randomly by 10 ears

in 3 groups. In the two experimental groups 2×10^6 /1ml ASCs was subcutaneously injected 7 days preoperatively and immediately before the operation. In the control group 1ml PBS was injected using the same method. In all three groups the chondrocutaneous composite flap was elevated and rotated 90 degrees and repaired to its original position.

Skin flow was assessed using laser Doppler at 1, 3, 6, 9, 12 days after surgery. At 1, 12 days after surgery, the viable area was assessed using digital photography and euthanasia was administered at the rabbits and immunohistochemical staining of CD 31 was performed to check the neovascularization. In conclusion, adipose derived stem cell treatment improved the survival of composite graft which was confirmed by survival area and histological evaluation. Although the difference of injection timing was not significant, preoperatively local injection of ASCs has also comparable results.

Key Words : Adipose derived stem cell, composite graft