

# 압착세기에 따른 비중격 연골의 생존율과 세포사의 기전

단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실,<sup>1</sup> 의학레이저 연구센터<sup>2</sup>

정영준<sup>1</sup> · 문태현<sup>1</sup> · 김인상<sup>1</sup> · 안진철<sup>2</sup> · 강정욱<sup>2</sup>

## Viability of Chondrocytes in the Crushed Septal Cartilage Depending on Degree of Crushing and Their Mechanism of Cell Death

Young-Jun Chung, MD<sup>1</sup>, Tae-Hyun Moon, MD<sup>1</sup>, In-Sang Kim, MD<sup>1</sup>, Jin-Chul Ahn, PhD<sup>2</sup> and Jung-Wook Kang, BA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery; <sup>2</sup>Medical Laser Research Center, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives** : To analyze the viability of chondrocytes according to different degrees of crushing and to investigate the mechanism of cell death in the crushed cartilage. **Subjects and Method** : Septal cartilages were obtained from 22 patients and cartilage pieces were allocated to four groups ; normal, mildly crushed, moderately crushed and severely crushed. The cartilage specimens were stained with hematoxylin-eosin and examined under light microscope. The viability of the chondrocytes and the mechanism of cell death were assessed using confocal laser scanning microscopy. **Results** : As crushing intensity increased, chondrocyte viability significantly decreased. The mechanism of cell death was mainly due to necrosis rather than apoptosis. **Conclusion** : The viability of chondrocytes in the crushed cartilage depends on the degree of crushing. The mechanism of cell death after crushing is mainly necrosis. Therefore, for the clinical use of the crushed cartilage, slight overcorrection and standardization of the degree of crushing are recommended. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:149-53)

**KEY WORDS** : Nasal septum · Crushing · Rhinoplasty · Mechanism of cell death.

## 서 론

외비 성형술시 비배부에 고르지 못한 부분이 나타나 이를 보완해야 하거나, 비첨 또는 비근부 등에 약간의 부분적 증대를 필요로 하는 경우가 흔하다.

이 때 사용되는 재료들로는 비중격 연골,<sup>1)</sup> 제거된 곡비(hump) 조직,<sup>2)</sup> 측두두정근막(temporoparietal fascia),<sup>3)</sup> 여러 종류의 동종이식 재료(allograft)<sup>4-6)</sup> 등이 있다. 이 중 비중격 연골은 동일 수술 부위에서 채취가 가능하고, 흡수가 적으며, 살아있는 자가 조직(living tissue)이고, 면역반응이 거의 없어<sup>7-9)</sup> 가장 선호된다. 이 때 비중격 연골은 원하는 모양으로 쉽게 변화시키기 위해, 또는 연골편의 두께를 줄여 미세한 변화만을 주거나 이식 후 가장자리가 눈에 띄지 않게 하기 위한 이유 등으로 흔하게 압착되어 사

용된다.<sup>10,12)</sup>

하지만 압착된 연골은 압착시의 물리적 힘의 크기가 커짐에 따라 연골세포의 생존율이 감소하는 것으로 알려져 있으며,<sup>10-12)</sup> 따라서 압착 후의 흡수 정도를 예측하기 힘든 단점이 있다. 그러나 현재까지 압착세기에 따른 연골세포의 생존율을 정량적으로 측정한 연구나 압착 후 세포사의 기전에 대한 보고는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에서는 압착세기에 따른 연골세포의 생존율 차이와, 세포사의 기전에 대해서 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 대상 및 준비

2008년 3월부터 2008년 5월까지 본원 이비인후과에서 비중격 교정술 및 외비 교정술을 시행받은 22명의 환자에서 수술시 비중격 만곡 부위의 잉여 부위에서 채취한 연골 절편을 사용하였으며, 환자들의 연령은 만 22세에서 48세 사이로 평균연령은 35세였으며, 남녀비는 7 : 4였다.

논문접수일 : 2008년 8월 6일 / 심사완료일 : 2008년 11월 27일

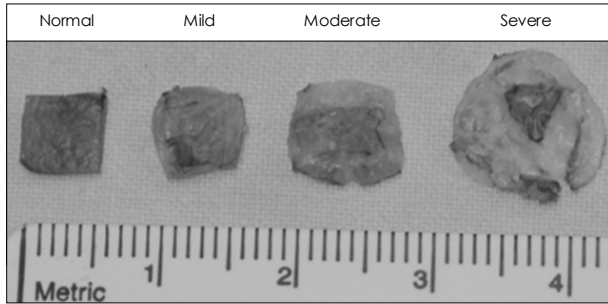
교신저자 : 김인상 330-715 충남 천안시 안서동 산16-5

단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실

전화 : (041) 550-3973 · 전송 : (041) 556-1090

E-mail : codocor@dreamwiz.com

실험군 및 대조군 설정을 위해 각 환자 당 5×5 mm 크기의 최소한 4개의 연골편이 필요하였으며, 따라서 채취된 잉여 연골, 또는 외비교정술시 이식을 위해 쓰고 남은 연골의 크기가 2×2 cm 이하였던 환자들은 대상에서 제외



**Fig. 1.** Four cartilage groups. Images from left to right correspond to normal, mildly crushed, moderately crushed, and severely crushed cartilage.

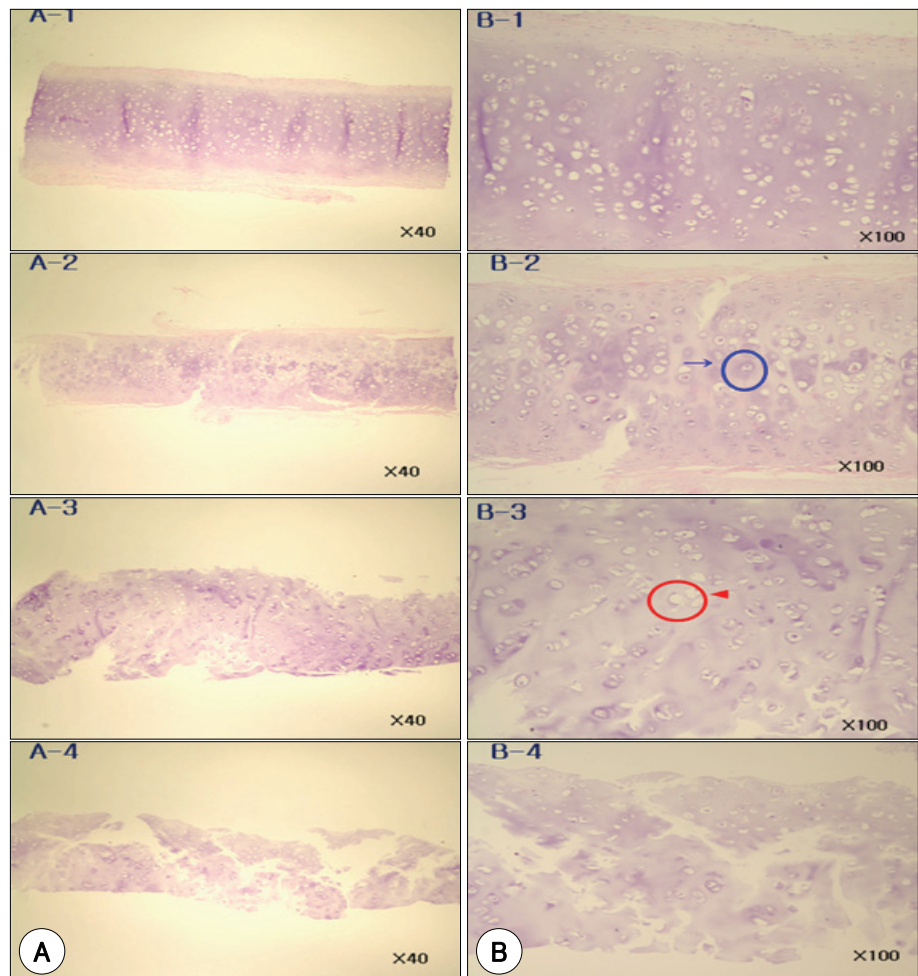
**Table 1.** Groups of cartilages according to degree of crushing

	Normal	Mildly crushed	Moderately crushed	Severely crushed
Diameter (mm)	5×5	5.1–7.0	7.1–8.5	8.6–10
Affection by gravity	No	No	Slight bend	Complete bend

하였다.

각각의 환자에서 채취한 비중격 연골은 자와 수술칼을 이용하여 5×5 mm 정사각형 형태의 연골편들로 나누었으며, 이후 연골 압착기(Cottle cartilage crusher, model 523900 ; Karl Storz GmbH & Co, Tuttingen, Germany)를 이용하여 서로 다른 강도로 압착하여 그 정도에 따라 총 4개의 그룹으로 나누었다(Fig. 1).

압착을 시행하지 않은 연골편을 정상군(normal)으로, 압착 후의 직경이 5.1~7.0 mm이며 중력에 의해 구부러지지 않는 것들을 경도 압착군(mildly crushed)으로, 직경이 7.1~8.5 mm이고 중력에 의해 약간 구부러지는 것들을 중등도 압착군(moderately crushed)으로, 직경이 8.6~10 mm이고 중력에 의해 완전히 구부러지는 것들을 고도 압착군(severely crushed)으로 정의하였다(Table 1).



**Fig. 2.** Hematoxylin-eosin (H & E) stain of crushed cartilage. A : As crushing degree increases, normal chondrocytes and tissue matrix are reduced. B : As crushing intensity increases, live cells (arrow) are reduced and dead cells (arrowhead) are increased. A : Magnification, ×40. B : Magnification, ×100. A-1, B-1 : Normal, A-2, B-2 : Mildly crushed, A-3, B-3 : Moderately crushed, A-4, B-4 : Severely crushed.

### 조직염색

조직학적인 변화를 평가하기 위해 각 조직은 3.7% formaldehyde 용액에 넣어 24시간 고정된 조직을 파라핀 포매한 후 5  $\mu$ m 두께로 박절하였다.

조직 한 개당 일정 간격의 절편 5개를 얻은 다음 Hematoxylin and eosin(H & E), 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 각 절편에 대하여 병리과 전문의의 도움을 받아 40~200배율하에서 광학현미경으로 관찰하여, 연골세포의 생존율, 조직배열과 바탕질(matrix)의 변화양상을 평가하였다.

### 생존율 평가

각 그룹간 연골세포의 생존율을 측정하기 위해, 상용화된 kit(LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit®, Molecular Probes Inc, Eugene, Ore)를 사용하여 염색한 후 공초점 현미경(Confocal microscopy, Zeiss LSM510 META, Germany)을 이용하여 관찰하였으며, 조직절편 당 20배율의 다섯 시야에서 살아있는 세포(live cell)와 죽은 세포(dead cell)를 카운트하여 평균을 구하였다.

### 세포사 기전 확인

세포사의 기전으로 괴사(necrosis)와 자멸사(apoptosis) 여부를 파악하기 위해 Hoechst & PI 염색을 시행한 후, 역시 공초점 현미경하에서 100배율로 관찰하였다.

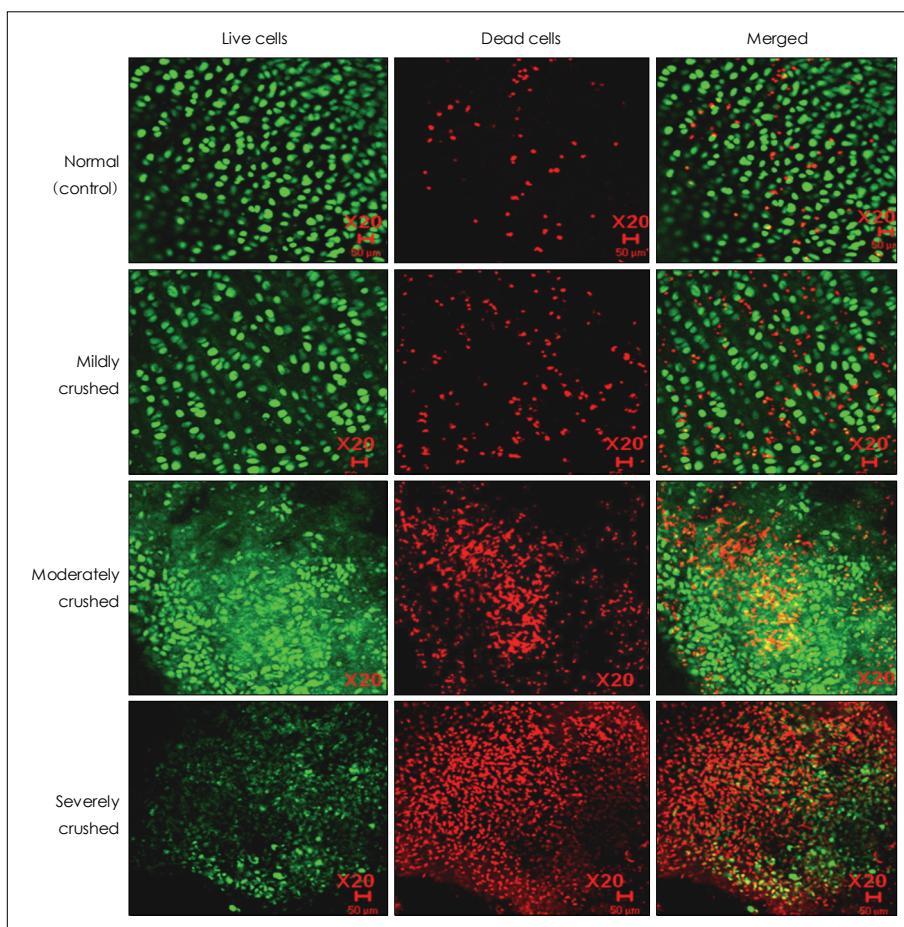
### 통계 분석

SPSS® version 14.0(SPSS, Chicago, IL)을 사용하였으며, 각 그룹간 비교 분석은 ANOVA test를 시행하였고  $p < .05$ 인 경우를 통계적으로 의미 있게 보았다.

## 결 과

### H & E 염색

저배율(40배)에서 관찰하였을 때 정상군에서 고도 압착군으로 갈수록 정상적인 조직배열이 파괴되어 있었으며, 호염기성(basophilic)으로 염색되는 바탕질(tissue matrix)의 양이 감소하는 양상이 관찰되었다(Fig. 2A). 또한 고배율(100배)로 관찰하였을 때, 고도 압착군으로 갈 수록, 연골소강(lacunae) 안에 핵이 관찰되지 않는 죽은 연골의 세



**Fig. 3.** Confocal microscopic images of crushed cartilages. Cells are stained for live (green) and dead (red) cells. The area of dead cells is markedly increased as crushing degree is increased (calcein-AM and ethidium homodimer-1 staining, original magnification  $\times 20$ ).



포수가 뚜렷하게 증가하는 양상이 관찰되었다(Fig. 2B).

#### Live & dead assay<sup>®</sup> (Calcein & EthD-1 염색)

정상군에서 중등도 및 고도 압착군으로 갈수록 살아있는 연골세포의 비율이 줄고, 죽은 세포(dead cell)의 비율이 뚜렷하게 증가하였다(Fig. 3). 각 조직 절편당 5개 이상의 저배율(20배) 시야에서 사진을 찍은 다음, 소프트웨어(Adobe Photoshop 7.0 software, Adobe Systems, San Jose, CA)를 이용하여 살아있는 연골세포와 죽은 연골의 세포 수를 카운트하였다. 살아있는 연골세포의 비율은 정상군에서 80%, 경도 압착군에서 약 53%, 중등도 압착군에서는 39%, 고도 압착군에서는 15%였으며, 각 그룹간에는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(Fig. 4).

#### Hoechst & PI 염색

압착된 연골세포의 세포사 기전이 괴사(necrosis)에 의한 것인지, 자멸사(apoptosis)에 의한 것인지 알아보기 위하여 Hoechst & PI 염색을 시행하였다.

정상군에서 고도 압착군으로 갈수록 적색으로 염색된 괴

사세포가 뚜렷하게 증가되어 관찰된 반면, 청색 분절로 보이는 자멸사세포는 모든 군에서 비슷하게 미미한 수준으로 관찰되었다(Fig. 5).

## 고 찰

외비 성형술 후 비배부에 고르지 않은 부분이 발견되는 경우가 흔하며, 이를 예방하기 위해서는 많은 수술 경험과 수술 중의 세심한 주의가 필요하다.

특히 충분한 주의를 기울였음에도 불구하고, 예측 정도와 다르게 이식물의 파다 또는 파소 흡수가 나타나 증장기 경과 관찰 중에 비배부의 굴곡(irregularity)이 나타나는 경우도 있으며,<sup>13)</sup> 또한 비첨부 또는 비근부에서의 이식물의 파다 또는 파소 흡수는 수술 후 불만족의 원인이 되기도 한다.

이러한 이식물의 흡수 정도를 결정하는 요인들로는, 이식물 자체의 생존력(viability), 이식물의 손상 정도, 혈관 공급 정도, 감염 유무, 수용자 요인(host factor) 등이 있을 수 있다. 하지만 대체로 자가 또는 동종 이식물의 정확한 흡수 정도를 예측하기는 매우 어려우며, 따라서 술자 개개인의 경험에 따라 어느 정도 과교정하는 것이 일반적이다.

비중격 또는 귀연골, 늑연골, 제거된 곡비(hump) 조직, 측두두정근막(temporoparietal fascia), 지방, 진피 조직 등의 외비 성형술시 사용되는 여러 자가 또는 동종 이식 조직 중 비중격 연골은 비교적 흡수가 적고, 동일 수술 부위에서 채취가 용이하며, 편평해서 일반적으로 가장 선호되는 이식 재료이다.<sup>11)</sup> 하지만 압착된 비중격 연골의 생존율에 대해서는 압착세기가 강할수록 연골의 생존율이 감소하는 것으로 일부 보고가 있을 뿐, 압착세기에 따른 생존율은 잘 알려지지 않았으며, 압착된 연골을 이용한 수술 결과에 대해서도 서로 다른 결과들이 보고되고 있다.<sup>12,14-16)</sup>

Cakmak 등은 압착 강도에 따라 연골을 다섯 그룹으로

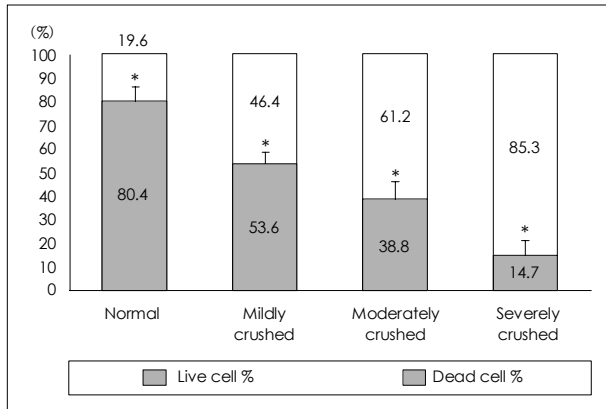


Fig. 4. ANOVA test. Relative rate (%) of live chondrocytes in different crushing groups. \* $p < 0.05$ .

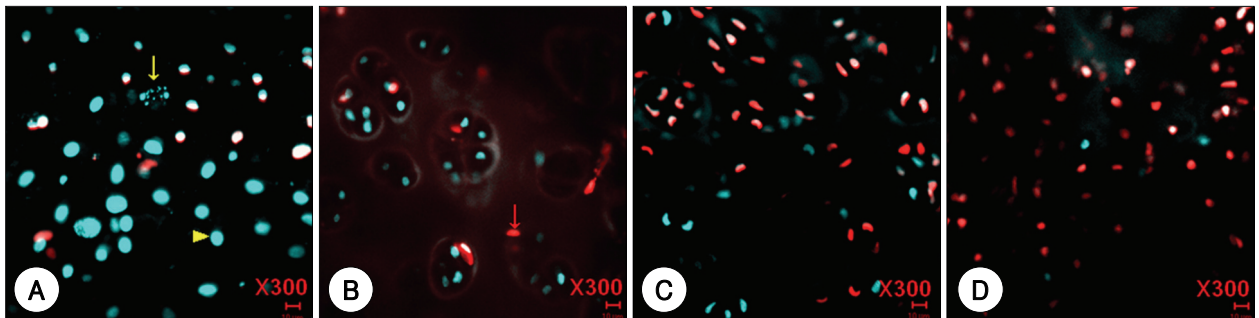


Fig. 5. Hoechst & PI staining of chondrocytes. Live cells are stained blue (arrowhead), apoptotic cells are stained as blue fragments (arrow), and necrotic cells are stained red (red arrow). Necrotic cells are dominant in moderately and severely crushed cartilages, however apoptotic cells are rarely observed in all groups (Hoechst & PI staining, original magnification  $\times 300$ . A : Normal. B : Mildly crushed. C : Moderately crushed. D : Severely crushed).

분류한 후 연골세포를 배양한 결과 압착된 세기가 강할수록 배양된 연골세포의 생존율이 감소한다고 보고하였으며, 이 때 배양된 연골세포의 생존율은 정상 대조군이 약 96%, slightly crushed는 92%, moderately crushed는 82%, significantly crushed는 72%, severely crushed의 경우에는 약 54%의 생존율을 보인다고 보고하였다.<sup>10)</sup> 이는 본 연구 결과보다 다소 높은 생존율 결과로서, 연골세포를 분리해 배양한 점과 압착 정도에 대한 기준이, 다른 것이 결과에 차이가 난 원인으로 생각된다.

본 연구에서 사용한 기준은 연골 압착기를 이용했을 때의 임상적인 기준으로서, 경도 또는 중등도 압착 정도가 임상에서 경험적으로 가장 일반적으로 이용되는 압착 정도이며, 많은 흡수를 원하지 않을 때 다소 약하게 압착한 정도가 경도, 흡수보다는 표면의 매끄러움을 주로 고려하여 부드럽게 만든 정도가 중등도 정도이다. 따라서 우리가 임상에서 통상적으로 압착하는 정도에서 연골세포의 생존율은 40~50% 정도일 것으로 생각된다.

하지만 심하게 압착된 경우에는 15% 이하의 연골세포만이 생존할 것으로 예상되며, 술자 스스로 경험에 따른 압착 정도에 대한 구체적 기준을 가지고, 지나치게 압착된 연골의 사용은 피하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Kazikdas 등은 압착된 연골을 토끼 등에 자가 이식한 결과, 연골의 압착 정도가 강할수록 연골세포의 생존율과 이식물의 부피(volume)가 감소되었다고 하였고, 강한 압착은 외비 교정술 후 부정적인 결과를 초래할 것으로 예상하였다.<sup>17)</sup>

하지만 괴사된 연골세포 부위에는 결체 조직이 증식되어 들어오는 것으로 알려져 있으며, 결체 조직 증식이 어느 정도 이식물 부피의 감소를 보상할 가능성이 있어, 연골세포의 괴사량과 이식물 부피의 감소는 정확하게 일치되지 않을 수도 있다.<sup>12,17)</sup> 따라서, 이식 후 시간에 따른 이식물의 부피 감소 정도에 대해서는 향후 동물 실험을 통한 추가적인 실험이 더 필요할 것으로 생각된다.

한편 압착된 연골에서 물리적 힘에 의한 직접적인 세포 괴사가 어느 정도인지 또는 이에 따른 자멸사가 어느 정도인지에 대해서는 그동안 보고된 사례가 없었다. 본 연구 결과에서는 모든 실험군에서 괴사(necrosis)가 세포사의 주를 이루었고, 자멸사(apoptosis)는 단지 정상 연골에서 일부 보이는 것과 같은 미미한 수준으로 관찰되었다. 따라서 압착 연골에서 연골세포의 세포사는 압착시의 물리적인 압력에 의한 즉각적인 괴사가 주요한 기전으로 생각되며, 자

멸사에 의한 세포 소멸은 유의하지 않은 수준일 것으로 생각되었다.

## 결 론

압착 연골은 압착 강도가 강할수록 연골세포의 생존율이 감소하는 것으로 나타났으며, 임상적인 압착 강도에서의 연골세포의 생존율은 40~50% 정도로 추정되었다. 이 때 연골세포의 세포사 기전은 대부분 세포 괴사(necrosis)에 의한 것이고 자멸사(apoptosis)는 거의 관여하지 않는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 비중격 · 압착 · 외비 교정술 · 세포사 기전.

## REFERENCES

- 1) McKinney P, Loomis MG, Wiedrich TA. Reconstruction of the nasal cap with a thin septal graft. *Plast Reconstr Surg* 1993;92 (2):346-51.
- 2) Skoog T. A method of hump reduction in rhinoplasty: A technique for preservation of the nasal roof. *Arch Otolaryngol* 1966;83 (3):283-7.
- 3) Baker TM, Courtiss EH. Temporalis fascia grafts in open secondary rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 1994;93 (4):802-10.
- 4) Kamer FM, Parkes ML. Gelatin film. A useful adjunct in rhinoplastic surgery. *Arch Otolaryngol* 1977;103 (11):667-70.
- 5) Gilmore J. Use of vicryl mesh in prevention of postrhinoplasty dorsal irregularities. *Ann Plast Surg* 1989;22 (2):105-7.
- 6) Stoll W. The use of polytetrafluoroethylene for particular augmentation of the nasal dorsum. *Aesthetic Plast Surg* 1991;15 (3):233-6.
- 7) Peer LA. The neglected septal cartilage graft (with experimental observations on the growth of human cartilage grafts). *Arch Otolaryngol* 1945;42:384-96.
- 8) Parker Porter J. Grafts in rhinoplasty: Alloplastic vs autogenous. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126 (4):558-61.
- 9) Cakmak O, Ergin T. The versatile autogenous costal cartilage graft in septorhinoplasty. *Arch Facial Plast Surg* 2002;4 (3):172-6.
- 10) Cakmak O, Buyuklu F, Yilmaz Z, Sahin FI, Tarhan E, Ozluoglu LN. Viability of cultured human nasal septum chondrocytes after crushing. *Arch Facial Plast Surg* 2005;7 (6):406-9.
- 11) Hides DL, Sage AB, Schumacher BL, Jadin KD, Agustin RM, Sah RL, et al. Stored human septal chondrocyte viability analyzed by confocal microscopy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132 (10):1137-42.
- 12) Cakmak O, Bircan S, Buyuklu F, Tuncer I, Dal T, Ozluoglu LN. Viability of crushed and diced cartilage grafts: A study in rabbits. *Arch Facial Plast Surg* 2005;7 (1):21-6.
- 13) Sheen JH. Spreader graft. *Plast Reconstr Surg* 1984;73 (2):230-9.
- 14) Hamra ST. Crushed cartilage grafts over alar dome reduction in open rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 1993;92 (2):352-6.
- 15) Stoksted P, Ladefoged C. Crushed cartilage in nasal reconstruction. *J Laryngol Otol* 1986;100 (8):897-906.
- 16) Huizing EH. Implantation and transplantation in reconstructive nasal surgery. *Rhinology* 1974;12:93-106.
- 17) Kazikdas KC, Erzur B, Tugyan K, Guneli E, Kaya D, Sahan M. Viability of crushed and diced cartilage grafts wrapped in oxidized regenerated cellulose and esterified hyaluronic acid: An experimental study. *Laryngoscope* 2007;117 (10):1728-34.