혈소판농축혈장이 조골세포주의 세포부착에 미치는 영향에 대한 연구

서울대학교 치과대학 치과보철학교실

정태욱·장경수·김창회·김영수

The Effect of Platelet-Rich Plasma on the Cellular Attachment of Osteoblast Cell Line

Tae-wook Jung, Kyung-Soo Jang, Chang-Whe Kim, Yung-Soo Kim

Department of Prosthodontics, Graduate School, Seoul National University

Platelet-rich plasma which is made with the newly developed technique concentrating platelets 3-folds or more is also proven to be very effective method to stimulate and accelerate the healing of bone and soft tissue. This study is aimed to investigate the effect of platelet-rich plasma on the attachment of osteoblast. To evaluate the effect on human, human osteoblast cell line was cultured. Platelet-rich plasma was extracted from the blood of a healthy volunteer. The effect on the attachment was evaluated by MTT assay. To evaluate autocrine and paracrine effect on osteoblast, conditioned medium was made and compared with platelet-rich plasma. By western blot analysis, the expression of fibronectin and vitronectin in experimental groups was examined.

The results were as following: The cellular attachment of osteoblast cell line increased depending on the concentration of platelet-rich plasma and conditioned medium. The amount of increasing was similar between two groups. The expression of fibronectin and vitronectin in platelet-rich plasma and conditioned medium is more than control group in western blot analysis.

These findings imply that platelet-rich plasma enhance the cellular attachment by inducing fibronectin, vitronectin from osteoblast and maximize the cellular attachment by using the autocrine and paracrine effect of platelet-rich plasma

Key word : Platelet-rich plasma, cellular attachment, conditioned medium fibronectin, vitronectin, autocrine, paracrine.

혈소판농축혈장이 조골세포주의 세포부착에 미치는 영향에 대한 연구

서울대학교 치과대학 치과보철학교실

정태욱·장경수·김창회·김영수

Ⅰ. 서 론

임플랜트가 개발된 이후로 수많은 주제로 연구들이 행해져 왔으며 이들의 연구들은 완전무치악에만 적용되었던 임플랜트를 전 보철영역으로 확대시키는데 결정적인 역할을 해왔다. 최근에는 보다 빠르고 기능적이며 심미적인 수복을 할 수 있도록 많은 연구가 이루어지고 있는데 대개 큰 두개의 주제를 중심으로 이루어지고 있다. 하나는 임플랜트가 보다 빨리 주변골들과 양호하게 결합할 수 있도록 임플랜트의 형태, 재료, 표면처리방법 등을 바꾸는 것이고 또 하나의 주제는 식립 후 임플랜트 계면에서의 창상치유과정에 관여하는 생물학적 인자들을 보다 효과적으로 기능할 수 있게 주변의 환경을 조절하는 것이다. 골형성을 촉진시키기 위해 주변 환경을 조절하는 방법으로 성장호르몬을 투여하는 방법[1], 지속적인 전기자극을 주는 방법[2]들이 시도되었지만 제한된 성과만을 얻을 수 있었다. 최근에는 차단막을 이용한 골유도재생술이나 세포의 분화와 증식에 중요한 국소적 조절인자(local regulator)로 작용하는 성장요소(growth factor)를 함유하고 있는 혈소판을 고농도로 농축해서 얻은 혈소판농축혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 이용하여 수술부위나 골 결손부위에 골대체재등과 함께 사용하는 방법들이 제시되고 있다. 혈소판농축혈장의 효과에 대하여 많은 문헌들이 보고 되고 있다. 하악골 재건술[3], 치주낭의 처치[4], 상악동 거상술[5], 치조제 증대술[6]등에 혈소판농축혈장을 자가골이나 골대체제등을 함께 사용했을 경우에 사용하지 않은 군보다 높은 골 형성 및 성숙도를 보인다고 하였다. 이런 실험결과들은 대부분 임상실험논문을 바탕으로 얻어진 것들이지만 혈소판농축혈장이 조골세포의 골 형성 능력을 향상시킨다는 가정을 충분히 뒷받침해준다. 조골세포의 골형성 과정은 세포부착(cellular attachment), 세포증식(cellular proliferation), 골기질 단백질의 분비(secretion of bone matrix protein), 골기질 경화(mineralization of bone matrix)등의 일련의 과정을 거치게 된다. 혈소판농축혈장의 골형성 항진효과는 조골세포의 각각의 골형성 단계에 영향을 끼쳐서 얻어진다고 생각된다. 이에 본 논문은 세포배양실험을 통해서 골 형성 과정의 초기 단계인 세포부착과정에서 혈소판농축혈장이 조골세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 세포부착분석을 통해서 혈소판농축혈장의 농도에 따른 부착변화를 관찰하고자 하였고 혈소판농축혈장의 autocrine, paracrine 효과를 보기 위해서 조건배지(conditioned medium, CM)을 제작하여 혈소판농축혈장과 비교 평가하였다. 세포부착에 중요하게 작용하는 세포외 기질 단백질인 fibronectin, vitronectin의 발현을 Western blot 분석을 통해서 확인하고자 하였다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 세포배양(cell culture)

사람의 조골세포주(osteoblast cell line)를 American Type Culture Collection (CRL-11372, ATCC, Manassas, USA) 회사에서 구입하고(Fig.1), 10%의 어



Fig. 1. Osteoblast cell line (CRL-11372, ATCC, Manassas, USA).



Fig. 2. Tissue culture flask 75cm2 (SARSTEDT, Newton, USA).

린송아지 혈청 (fetal bovine serum; FBS: Gibco, Carlsbad, CA, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12; GibCo, Carlsbad, CA, USA)이 든 조직배양플라스크 (Tissue culture flask 75cm^2, SARSTEDT, Newton, USA)에서 키웠다(Fig.2). ATCC에서 세포 구입당시 보내준 protocol 대로 2.5mM L-glutamine(SIGMA, St.Louis, MO, USA), 15mM HEPES (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 0.5mM soidum pyruvate(SIGMA, St.Louis, MO, USA), 1.2g/L sodium bicarbonate (SIGMA, St.Louis, MO, USA), 0.3mg/ml G418(Gentamycin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 배양액에 첨가하였으며 5% CO_2하에서 34℃,100%습도의 조건이 유지되는 세포배양기(Multi Gas CO_2 incubator, ASTEC, JAPAN)에서 배양하였다(Fig.3). 공급사에서 보고한 세포가 두 배로 증식하는 시간(doubling time)은 36시간이었다.

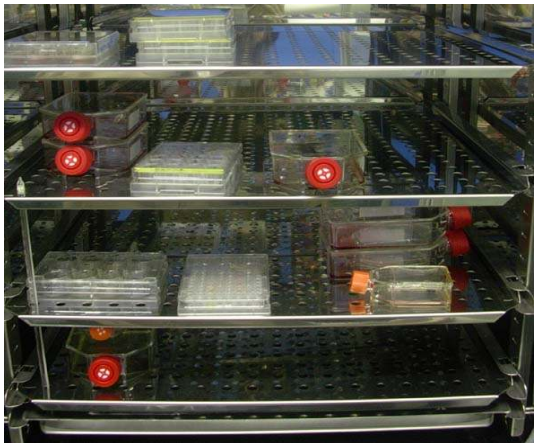


Fig. 3. Multigas CO2 incubator (ASTEC, Fukuoka, Japan).

2. 혈소판농축혈장의 제조

혈소판농축혈장 제조를 위하여 56mL의 항응고제인 citrate phosphate dextrose adenine (CPDA)가 든 채혈주머니(blood collection bag)에 (Fig.4) 신체 건강한 실험자 한명의 전혈을 직접 채혈하여 총 400mL의 채혈주머니를 만들었다. 이것을 실온에서 IEC central GP8R centrifuge (IEC, International Equipment Company, Needham Heights, MA, USA)를 이용하여



Fig. 4. Blood collection bag.



Fig. 5. IEC central GP8R centrifuge (IEC, Needham Heights, MA, USA) (left;outside view, right;inside view).



Fig. 6. Platelet Rich Plasma (left: acquired PRP, right:PRP in use).

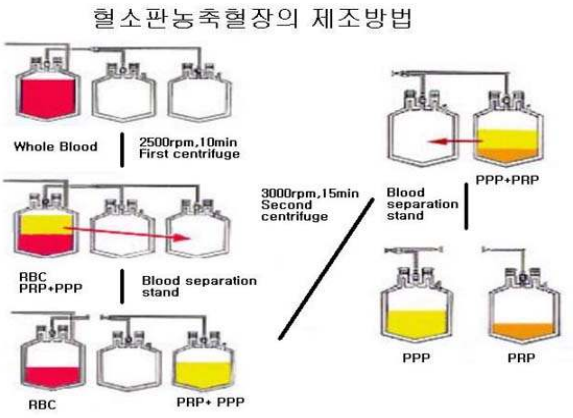


Fig. 7. Diagram for PRP preparation.



Fig. 8. Conditioned medium of PRP.

(Fig.5) 2500 rpm(1400g)으로 10분간 원심분리를 시행하여 적혈구층을 혈액분리대(blood separation stand)를 이용하여 분리해 내었다. 적혈구층을 분리한 후 나머지 혈장을 상온에서 3000rpm (2010g)으로 15분간 두 번째 원심분리를 시행하여 50mL 가량의 혈소판농축혈장을 얻었다. 얻은 혈소판농축혈장을 -70℃ 초저온냉동기(deep freezer)에 보관하였다가 실험에 사용하였다(Fig.6). 혈소판농축혈장을 얻는데 걸리는 시간은 30분정도였다. 실험자의 전혈내의 혈소판 수는 239,000개/uL로 정상범주에 속했으며 혈소판농축혈장에서는 1,107,000개/uL로 약 463% 혈소판 농축이 이루어 졌다. Fig.7은 이 과정을 요약해서 그린 그림이다.

3. 혈소판농축혈장의 조건배지의 제조

조골세포주를 100mm^{2}의 세포배양접시(cell culture dish: Falcon, Becton Dickinson, USA)에 80-90%로 충만해질 때가지 배양한 후 어린송아지 혈청이 포함되지 않은 5ml DMEM 배지로 교체하여 48시간 동안 세포배양기하에 정치하였다가 100ul/mL의 혈소판농축혈장을 배양액에 추가하여 약 2시간 정도 혈소판농축혈장에 세포를 노출시킨 후, 다시 어린송아지 혈청이 포함되어있지 않은 5ml의 DMEM 배지로 교체하여 24 시간 동안 배양기 하에 둔 뒤 배양액을 모았다(Fig.8). 이렇게 하여 모아진 배양액속의 단백질은 혈소판 농축 혈장에

의해 활성화된 조골세포주로부터 유리된 단백질이라 할 수 있다.

4. MTT 분석법을 이용한 세포부착분석(cell attachment assay)

모든 실험에 사용된 세포는 10% 어린 송아지 혈청이 포함된 DMEM/F12 배지에서 키웠다. 세포부착분석을 위해 10% 어린 송아지 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지가 담긴 96 well culture plate (Falcon,Becton Dickinson,USA)에 조골세포주를 2×10^5cell/mL의 농도로 0.1mL 씩 분주를 하였다 (Fig.9). 분주 후 곧바로 실험군과 대조군으로 분리하여 실험군에는 혈소판농축혈장을 1ul/mL, 3ul/mL, 5ul/mL, 10ul/mL 의 농도로 첨가하였다. 대조군에는 혈소판농축혈장을 처리하지 않고 어린 송아지 혈청이 포함되지 않은 DMEM을 첨가하여 정치해두었다. 또, 혈소판농축혈장에 의해 조골세포주로부터 유리되는 단백질의 효과를 보기 위하여 혈소판농축혈장의 조건배지를 1ul/mL, 3ul/mL, 5ul/mL, 10ul/mL 의 농도로 첨가하여 정치해 두었다. 혈소판농축혈장과 그의 조건배지를 첨가한 후 34℃,5% CO_2,100% 습도의 조건이 유지되는 세포배양기에서 세포를 정치하였으며 2시간 후 phosphate buffer saline(PBS) 로 2회 세척을 통해 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 이 후, 0.05% Trypsin-0.025M EDTA 용액 100ul를 첨가하여 34℃에서 10분간 배양한 후 MTT assay를 시행하여 분광측정기(sphectrophotometer, GeneSecIII, Hitachi, Japan)를 이용하여 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. MTT 분석법은 노란색을 띠는 tetrazolium이라는 물질이 대사활동이 활발한 세포내에 존재하는 탈수소효소(dehydrogenase)에 의하여 갈색을 띠는 formazan 이라는 물질로 전환되는 성질을 이용한 것으로 반응 후 형성된 fromazan의 양은 흡광도를 통해서 측정한다. 이 흡광도는 살아있는 세포수와 정비례한다. 본 실험에서는 MTT 분석시약으로 CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent(Promega, Madison WI. USA)을 사용하였다.

5. Immunoblotting 법을 이용한 fibronectin과 vitronectin 생성의 측정(Western blot analysis)

혈소판농축혈장과 조건배지에 의해 조골세포주로부터의 세포외 기질 부착 단백질인 피브로넥틴과 비트로넥틴이 발현되는 것을 관찰하기 위해서 Western blot을 이용하여 확인해 보기로 하였다. $100mm^2$ 세포 배양 접시에 조골세포주를 $2X10^4$ cell/mL 의 농도로 분주한 후 세포가 80-90%로 충만해지면 어린 송아지 혈청이 없는 DMEM 배지로 교환해 주고 24시간이 지난 후 실험군에는 혈소판농축혈장과 조건배지를 각각 10ul/mL의 농도로 첨가해 주었다. 24 시간이 지난 후 배양액을 모아서 Bradfort법을 이용해 단백질 농도를 측정하고 각 표본에서 Centricon YM-3 (Millipore, Billerica, Mass , USA)를 이용하여 10ug의 단백질을 농축한 다음 6% SDS-PAGE에 전기영동한 후 nitrocellulose paper (Hybond-C, Amersham Pharmacia Biotech, USA)에 60mA로 하룻밤 동안 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막을 5% non-fat dry milk with 1% Tween-tris-buffered saline (TBST)로 3시간동안 4℃에서 blocking 한 후 15분씩 2회 TBST로 세척하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 피브로넥틴의 경우 SIGMA-ADRICH (Sigma, St.Louis, MO, USA)로부터, 비트로넥틴은 BD bioscience (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)로부터 구입하였으며 각각 1:2500, 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 12시간 동안 반응시켰다. 2차항체로 anti mouse Ig-G antibody (Sigma, St. Louis, MO)을 1:5000으로 희석하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 각각 5분씩 TBST 로 3회 세척 한 후 chemiluminescent substrate (ECL kit; Amersham, USA)를 사용하여 HRP 의 활성을 분석하였다.

6. 통계분석

각각의 실험은 3번씩 반복되었으며 각 실험에서 얻어진 흡광도의 값은 평균값을 표시하였다. 각 군간의 비교를 위해서 Student's t-test를 사용하였다. P 값이 0.05이하인 경우에는 유의성 있는 차이가 있는 것으로 분석하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 혈소판농축혈장 농도에 따른 세포부착의 변화

Table 1은 각 실험군의 세포부착과 관련된 평균 흡광도의 값을 보여주고 있다. 혈소판농축혈장의 농도의 증가에 따라 세포부착이 증가하는 것을 볼 수 가 있다. 특히 5ul/mL, 10ul/mL에서는 통계적으로 유의성있는 부착의 증가가 나타났다($p<0.05$).

Fig. 9는 대조군을 100%로 하고 환산한 실험군 값들을 비교한 것이다. 농도에 따라서 10ul/mL (51.02%), 5ul/mL(29.93%), 3ul/mL(15.08%), 1ul/mL (2.54%)순으로 세포부착의 증가가 나타났다.

2. 혈소판농축혈장의 조건배지 농도에 따른 세포부착의 변화

혈소판농축혈장의 조건배지를 1, 3, 5, 10ul/mL의 농도로 증가시키면서 첨가 하였을 때 table 2와 같이 세포부착이 증가하는 양상을 보였고 5ul/mL, 10ul/mL에서 유의성있는 세포증가가 나타났다 ($P<0.05$). 증가량에 있어서 혈소판농축혈장과의 유의할만한 차이는 없었다($p>0.05$).

Fig. 10은 대조군을 100%로 하고 환산한 실험군 값들을 비교한 것이다. 혈소판농축혈장군과 마찬가지로 농도의 증가에 따라 10ul/mL(49.25%), 5ul/mL (27.47%), 3ul/mL(15.93%), 1ul/mL(0.84%)의 세포부착의 증가를 보였다.

3. fibronectin과 vitronectin 확인을 위한 Western blot분석

혈소판농축혈장과 조건배지에서 키운 세포의 배지에서 fibronectin과 vitronectin에 대한 Western blot 분석을 시행한 결과 fig.11.에서 보는 바와 같이 fibronectin의 분자량인 220kd부근에서 대조군과 함께 발현이 관찰되었다. 하지만 혈소판농축혈장군과 조건배지군에서 띠의 두께가 대조군에 비해 넓게 나타났다.

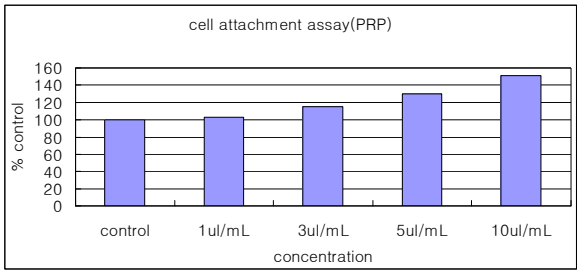


Fig. 9. The effect of platelet-rich plasma on the cell attachment(% control).

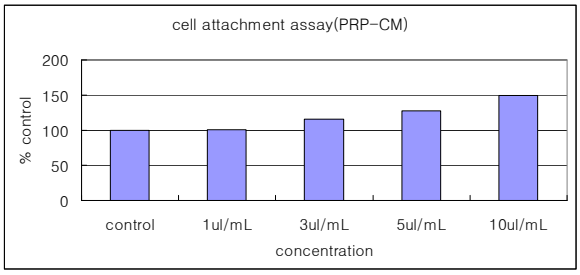


Fig. 10. The effect of conditioned medium on the cell attachment(% control)

Table 1. The effect of platelet-rich plasma on the cell attachment(OD, n=5)

	O.D.(450nm)	S.D.(E-02)	% control
control	0.0590	0.51	100.00
1ul/mL	0.0605	0.45	102.54
3ul/mL	0.0679	0.53	115.08
5ul/mL	0.0767*	0.55	129.93
10ul/mL	0.0891*	0.65	151.02

(n: number of experiments, O.D.: mean absorbance at 450nm, *: $P<0.05$, t-test, significant difference compared to control group)

Table 2. The effect of conditioned medium on the cell attachment(OD, n=5)

	O.D.(450nm)	S.D.(E-02)	% control
control	0.0590	0.51	100.00
1ul/mL	0.0595	0.75	100.84
3ul/mL	0.0684	0.65	115.93
5ul/mL	0.0752*	1.03	127.47
10ul/mL	0.0881*	1.05	149.25

(n: number of experiments, O.D.: mean absorbance at 450nm, *: P<0.05, t-test, significant difference compared to control group)



control PRP PRP-CM

Fig. 11. The expression of fibronectin(220kd, Western blot analysis).

control PRP PRP-CM

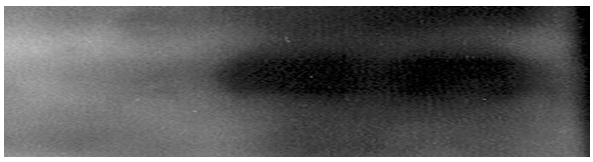


Fig. 12. The expression of vitronectin(65-75kd, Western blot analysis).

Fig.12.는 vitronectin의 발현을 보여주는데 대조군과는 다르게 분자량인 65-75kd 근처에서 명확한 띠가 관찰되었다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

임플랜트 식립 후 일어나게 되는 치유과정은 일반적인 창상치유과정을 따르게 된다. 임플랜트 식립을 위해 형성된 골수용부는 손상부위가 되어 혈병등이 차게 되고 이어서 임플랜트가 수용부에 식립되고 나면 임플랜트와 골수용부 사이, 즉 임플랜트 계면에서 활발한 치유과정이 시작된다. 기능적인 부하를 견뎌낼 수 있는 성공적인 골 융합이 되기 위해서는 임플랜트 계면에 연조직이나 섬유성조직의 개재 없이 직접적인 골기질과 조골세포의 침착이 일어나야 하고 가능한 넓고 많은 계면에서 골 형성이 일어나야 한다.[7] 이런 골 형성 반응의 시작은 주변의 조골세포가 임플랜트 표면에 적절히 부착되면서 이루어진다.

세포의 부착은 세포의 증식, 이동, 분화등이 일어나기 위한 가장 기본적인 과정이다.[8] 조골세포를 포함한 일반적인 세포의 부착기전은 세포외 기질(extracellular matrix)내에 존재하는 부착단백질(attachment protein)과 세포의 세포막에 존재하는 integrin이라는 결합수용체(attachment receptor)의 결합으로 인한 세포내의 세포골격 단백질(cytoskeletal protein)들의 상호작용을 통해서 이루어진다. 세포의 부착을 증가시키는 세포외 기질 부착 단백질에는 fibronectin, vitronectin, 교원섬유질(collagen), laminin등이 있고 부착에 관여하는 세포골격 단백질에는 actin, vincullin, talin등이 있다. Integrin과 세포외 기질 부착 단백질간의 결합이 세포막의 여러 focal adhesion site에서 이루어지면 세포내의 세포골격 단백질들의 연쇄반응이 일어나 세포내 구조의 변화를 통해, 형태변화, 부착과 이동반응이 발생하게 된다.[7-10]

임플랜트로의 세포부착에 대한 이전 연구들을 살펴보면 크게 임플랜트 표면 형태의 변화에 따른 부착상태에 대한 연구와 부착을 증진시킨다는 물질을 투여했을 때의 부착상태에 대한 연구로 나뉜다. 표면형태에 관한 연구들을 살펴보면, Bowers[11]등은 규칙적인 표면 거칠기를 가진 타이타늄 표면, 불규칙적인 거친 표면을 가진 sandblasting한 표면, 불규칙

적인 표면을 가졌지만 상대적으로 거칠기가 낮은 acid etching한 표면을 대상으로 세포배양실험을 통해 거칠면서 불규칙적인 표면형태를 가진 sandblasting한 표면에서 가장 높은 세포부착양상을 보인다고 보고하였다. Chang[12]등은 타이타늄 표면과 hyroxyapatite로 처리한 표면상에서 세포부착차이를 비교, 연구한 결과 좀 더 거친 표면거칠기를 가진 hyrodxypapatite로 표면처리한 군에서 세포부착이 유의하게 증가하였다고 보고하였다. 이상과 같은 임플랜트의 표면변화에 따른 세포부착에 대한 연구들은 표면의 거칠기가 평탄한 것 보다는 거친 것이 세포부착에 유리하다는 것을 알려주고 있다. 부착을 증진시킨다는 물질을 첨가하는 연구들은 주로 세포부착에 관여하는 세포외기질 단백질을 임플랜트 표면에 도포하여 영향을 알아본 것들로 Geibler[9] 등은 임플랜트표면에 collagen type 1을 도포한 결과 조골세포의 현저한 세포부착증가가 관찰되었다고 보고하였으며 Park[13]등은 세포외 기질을 구성하는 다양한 단백질중에서 임플랜트 표면에 도포하였을 때 가장 효과적으로 구강상피세포를 임플랜트에 부착시키는 것은 type 4 collagen이라고 보고하였다.

본 연구는 부착을 증진시키는 물질을 첨가해서 그 변화를 보고자 한 것으로 조골세포의 활성에 큰 영향을 끼친다고 알려진 혈소판농축혈장을 이용하였다. 그리고 혈소판농축혈장의 조건배지를 이용하여 autocrine, paracrine 효과를 알아보려고 하였다. 조건배지는 자극이 가한 배지에서 일정시간 세포를 배양한 후 그 배지를 씻어 버리고 단백질이 없는 새로운 배지로 교체하여 자극을 받은 세포를 24-48시간 동안 다시 배양해서 모은 배지를 말한다. 이 배지를 분석하면 세포의 증식이나 분화단계에 있어서 당시의 세포의 기능을 알 수 있게 된다. 즉 조건배지에서 찾아지는 단백질들을 분석하면 자극을 받은 세포가 어떤 단백질을 합성, 분비해내는 가를 알 수 있게 되며 또한 이런 물질들이 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 끼치는지를 알 수가 있게 된다.

Table 1과 fig.9를 보면 혈소판농축혈장에서 농도의 증가에 따라서 세포부착이 증가하는 것을 알 수가 있다. 이런 세포부착의 증가양상은 혈소판농축혈장내의 세포부착을 매개하는 물질이 많아서 나타날 수도 있고 간접적으로 세포부착을 증가시킬 수 있게 주변여건을 조성하여 나타날 수도 있다. Marx 등[14]의 연구에 의하면 혈소판농축혈장은 일반혈장과는 단지 성장요소가 많이 함유된 혈소판을 고농도로 농축하고 있다는 점이 다르지 세포부착에 영향을 끼치는 섬유소(fibrin), fibronectin, vitronectin등의 세포외 기질 단백질은 일반혈장과 같은 농도를 가지고 있다고 하였다. 이러한 보고는 혈소판농축혈장에 의한 세포부착의 증가양상이 직접적인 혈장내의 요소에 의한 것이기 보다는 부착이 증가될 수 있게 주변환경의 변화에 의해 나타난 것이라는 것을 말해준다.

Table 2와 fig.10은 혈소판농축혈장의 조건배지에 의한 영향을 나타내고 있는데 혈소판농축혈장이 미치는 영향과 비슷한 증가양상 및 증가량을 보이고 있다. 이는 혈소판농축혈장과 조건배지는 비슷한 생물학적 활성을 가지고 있다는 것을 의미한다. 즉, 혈소판농축혈장이 조골세포의 대사과정에 관여하여 부착을 증가시킬 수 있는 단백질을 분비하게 하고 이 단백질들은 또 다시 조골세포들로 하여금 부착을 증가시키는 단백질의 생성을 유도함으로써 이와 같은 결과가 나타날 수 있는데 이는 조골세포의 혈소판농축혈장에 대한 autocrine, paracrine 효과를 말해준다.

Fig. 11과 12는 세포부착에 관여하는 세포외기질 단백질인 fibronectin, vitronectin이 혈소판농축혈장과 조건배지에서 발현되고 있음을 보여주는 Western blot 분석이다. 이 분석에서 fibronectin은 vitronectin과 달리 대조군에서도 많이 관찰되는 것을 알 수가 있다. 이는 fibronectin이 다른 세포외기질 단백질들 보다 초기에 골형성과정인 조골세포 전구세포의 증식과 기질침착과정에서 발현된다는 보고[7,15]와 관련이 있는 듯 하다. 하지만 혈소판농축혈장과 조건배지를 첨가한 군에서 대조군보다 굵은 띠가 관찰되는데 이는 fibronectin이 더 많은 양으로 발현되어 있음을 말해준다. Vitronectin의 경우는 대조군에는 나타나지 않았지만 실험군에서는 발현이 되었다. 조골세포는 각각의 분화단계마다 특정단백질을 생성하는 성질을 띠는데 혈소판농축혈장과 조건배지를 첨가한 경우에 조골세포의 활성화를 통해서 발현단계를 촉진하였기 때문에 vitronectin과 같은 결과가 나타났다고 생각된다.

이상과 같은 결과를 통해서 혈소판농축혈장은 조

골세포로 하여금 부착에 필요한 세포외기질 단백질인 fibronectin과 vitronectin등을 생성, 유도함으로써 세포부착을 증가시키며 이는 조골세포의 autocrine, paracrine효과에 의해서 극대화된다는 것을 알 수가 있다.

모든 세포의 상호작용은 매개체를 이용해서 신호를 주고 받으면서 이루어진다. 혈소판농축혈장내에는 매개체의 역할을 할 수 있는 성장요소가 다량 함유되어 있지만 본 실험에서는 이들 상호간의 관계를 알아보지 못했다. 혈소판농축혈장의 골형성항진효과와 성장요소간의 상호관계에 대해서 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

Ⅴ. 결 론

본 논문은 세포배양실험을 통해서 골 형성 과정의 초기 단계인 세포부착과정에서 혈소판농축혈장이 어떤 기전으로 조골세포에 영향을 미치는 지를 알아보고자 계획되었다. 세포부착분석을 통해서 혈소판농축혈장의 농도에 따른 부착변화를 관찰하고자 하였고 혈소판농축혈장의 autocrine, paracrine 효과를 보기 위해서 조건배지를 제작하여 혈소판농축혈장과 비교 평가하였다. 세포부착에 중요하게 작용하는 세포외 기질 단백질인 fibronectin, vitronectin 발현을 Western blot 분석을 통해서 확인하고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈소판농축혈장의 농도가 증가할수록 세포부착은 증가하였다.
2. 혈소판농축혈장의 조건배지의 농도가 증가할수록 세포부착은 증가하였으며 증가량과 양 상은 혈소판농축혈장군과 비슷하였다.
3. Western blot 분석에서 혈소판농축혈장과 조건배지를 첨가한 군에서 fibronectin은 대조군보다 많은 양이 발현되어 있음이 관찰되었으며, vitronectin은 발현되지 않은 대 조군과 달리 두 실험군에서 발현이 관찰되었다.

이상과 같은 결과를 통해서 혈소판농축혈장은 조골세포로 하여금 부착에 필요한 세포외기질 단백질인 fibronectin과 vitronectin등을 생성, 유도함으로써 세포부착을 증가시키며 이 반응은 조골세포의 autocrine, paracrine 효과에 의해서 극대화된다는 것을 알 수 가 있다. 이런 혈소판농축혈장의 세포부착 항진효과는 이 후 일어나는 일련의 골형성과정을 더욱 촉진한다. 이는 골질이 좋지 않은 곳에 임플랜트를 식립한 경우에 혈소판농축혈장을 적용하면 치유기간 초기에 임플랜트주변 골형성을 촉진하여 보다 빠르고 양호한 결과를 얻을 수 있음을 말해준다.

참 고 문 헌

1. Wittbjer J, Rohlin M, Thorngren KG. Bone formation in demineralized bone transplants treated with biosynthetic human growth hormones. Scan J Plast Reconstr Surg 1983;17:109-118.
2. Park JB, Young SO, Kenner GH. Dental implant fixation by electrically mediated process. Biomater Med Devices Artif Organ. 1978;6:291.
3. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM et al. Platelet-rich plasma : growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod 1998;85:638-646.
4. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M et al. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: A reentry study. J Periodontal 2002;73:198-205.
5. Rosenberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma - initial case presentation. Pract Periodont Aesthet Dent 2000;12(9):843-850.
6. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. J Periodontol 2000;71:1654-1661.
7. Krause A, Cowles EA, Gronowicz G. Integrin-mediated signaling in osteoblast on titanium implant materials. J Biomed Mater Res 2000;52:738-747.
8. Anselme K, Bigerelle M, Noel B et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. J Biomed Mater Res 2000;49:155-166
9. Geibler U, Hempel U, Wolf C et al. Collagen type 1-coating of Ti6Al14V promotes adhesion of osteoblast. J Biomed Mater Res 2000;51:752-760.
10. Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. J

Dent Res 2001;80(6):1540-1544.
11. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast response in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants 1992;7: 302-310.
12. Chang YL, Stanford CM, Wefel JS et al. Osteoblastic cell attachment to hydroxyapatite - coated implant surfaces in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants 1999;14:239-247.
13. Park JC, Kim HM, Ko JS. Effects of extracellular matrix constituents on the attachment of human oral epithelial cells at the titanium surface. Int J Oral Maxillofac Implants 1998;13:826-836.
14. Mark RE. Platelet-rich plasma(PRP) : What is PRP and what is not PRP?. Implant Dentistry 2001;10(4): 225-228.
15. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G et al. Mineralization and the expression of bone matrix proteins during in vivo bone development. Calcif Tissue Int 1998;62:74-82.