혈소판농축혈장이 조골세포주의 세포증식 및 분화에 미치는 영향에 대한 연구

서울대학교 치과대학 보철학교실

정태욱·장경수·김창회·김영수

A Study of the Effect of Platelet-Rich Plasma on the Cellular Proliferation and Differentiation of Osteoblast Cell Line

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

Department of Prosthodontics, Graduate School, Seoul National University

The osseointegration in implant therapy is achieved following general wound healing mechanism. Platelet play a major role in wound healing process. In addition to blood clot formation, they secrete many growth factors which regulate the attachment, proliferation and differentiation of nearly all cell types. The use of these growth factors is now known to be very effective methods to improve the cellular activity. 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. Previous study proved that platelet-rich plasma enhanced the cellular attachment by inducing fibronectin, vitronectin from osteoblast. So, this study was aimed to investigate the effect of platelet-rich plasma on the cellular proliferation and differentiation in vitro. The effect on the proliferation was evaluated by MTT assay. To evaluate autocrine and paracrine effect, conditioned medium was made and compared. By measuring alkaline phosphatase activity, the effect on the cellular differentiation was evaluated.

The results were as following: The cellular proliferation of osteoblast cell line increased depending on the concentration of platelet-rich plasma and conditioned medium. The alkaline phosphatase activity increased depending on the concentration of platelet-rich plasma and conditioned medium.

These findings imply that platelet-rich plasma enhance the cellular proliferation and differentiation and maximize the cellular activity by using the autocrine and paracrine effect.

Key words : platelet-rich plasma, cellular proliferation, differentiation. conditioned medium, alkaline phosphatase activity.

혈소판농축혈장이 조골세포주의 세포증식 및 분화에 미치는 영향에 대한 연구

서울대학교 치과대학 보철학교실

정태욱·장경수·김창회·김영수

Ⅰ. 서 론

완전 무치악 환자의 수복을 위해 처음으로 시도되어졌던 임플랜트는 장기간의 양호한 결과를 바탕으로 현재는 단일 치아 수복을 포함한 거의 모든 보철영역에서 사용되고 있다. 영역의 확대와 더불어 성공의 전제조건이었던 양호한 치조골의 상태와 충분한 치유기간의 부여에 대한 개념도 많이 바뀌게 되었다. 골양이 부족한 경우에는 골유도재생술, 골이식술, 상악동 거상술등을 통해 성공적으로 임플랜트를 식립할 수 있게 되었고 골질이 나쁜 경우에도 임플랜트의 형태, 표면처리 등을 골생성에 유리하게 변화시켜 우수한 골융합을 얻을 수 있게 되었다. 이런 발전에는 골융합에 대한 본질적인 이해의 증가, 수술기술의 발달과 임플랜트 재료, 표면 처리 방법들의 진보에 힘입은 바가 크다. 최근에는 치료기간을 단축시키려는 시도들이 많이 행해지고 있는데 그 중 하나가 혈소판농축혈장(Platelet rich-plasma, PRP)을 이용하는 것이다. 이는 창상치유과정에서 성장요소(growth factor)들이 지대한 영향을 끼친다는 사실에 입각하여 성장요소를 많이 함유하고 있는 혈소판을 수술 전에 혈액에서 채취, 고농도로 농축시킨 다음 수술부위에 첨가하여 보다 빠르고 양호한 치유결과를 얻고자 하는 방법이다. 이 혈소판농축혈장이 가지는 생물학적 효용성에 대해서는 논란의 여지가 여전히 존재하지만 많은 임상연구를 통해 혈소판농축혈장이 창상치유를 촉진시킨다는 것은 사실로 받아들여지게 되었다. 임플랜트가 식립되면 골과의 계면에서 세포부착(cellular attachment), 골기질 단백질의 분비(secretion of bone matrix protein), 골기질 경화(mineralization of bone matrix)등의 일련의 골형성 과정이 일어나는데 여기에도 혈소판농축혈장은 효과적으로 이용될 수 있다. 본 논문은 세포배양실험을 통해 혈소판농축혈장이 조골세포에 미치는 생물학적 영향을 알아보고자 하였다. 이전 논문을 통해서는 골형성 과정의 초기 단계인 세포부착과정이 혈소판농축혈장의 첨가로 촉진된다는 사실을 알 수가 있었다. 이에 본 논문은 혈소판농축혈장이 조골세포의 증식과 분화에는 어떤 영향을 끼치는지를 알아보기 위해서 계획되었다.

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 어린송아지 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 sodium pyruvate(SIGMA, St.Louis, MO, USA), 1.2g/L sodium bicarbonate (SIGMA, St.Louis, MO, USA), 0.3mg/mL G418(Gentamycin,



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



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

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 배양액에 첨가하였으며 5% CO_2하에서 34℃, 100% 습도의 조건이 유지되는 세포배양기(Multi Gas CO_2 incubator, ASTEC, Fukuoka, Japan)에서 배양하였다(Fig.3). 공급사에서 보고한 세포가 두 배로 증식하는 시간(doubling time)은 36시간이었다.

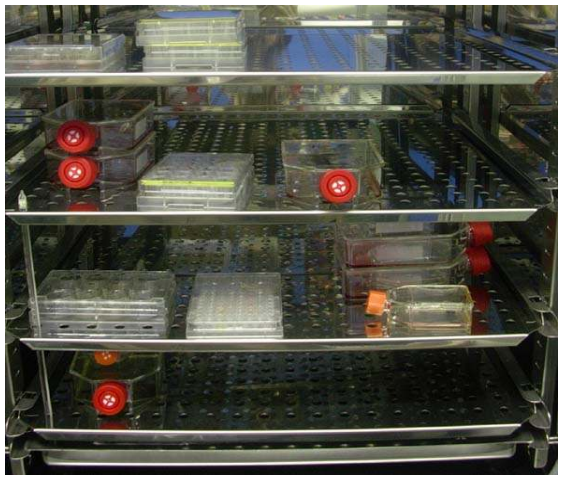

Fig. 3. Multigas CO2 incubator (ASTEC, Fukuoka, Japan).

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.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



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).

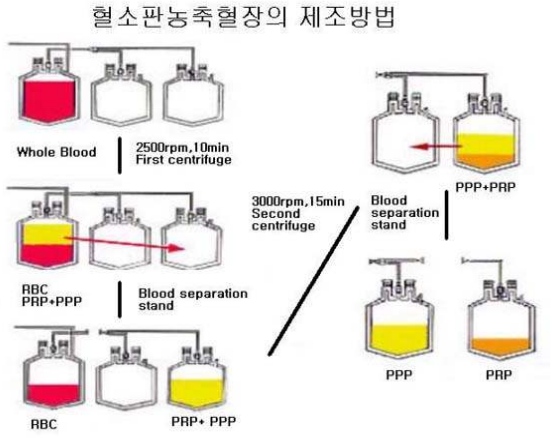

Fig. 7. Diagram for PRP preparation.



Fig. 8. Conditioned medium of PRP.

463% 혈소판 농축이 이루어 졌다. Fig.7은 이 과정을 요약해서 그린 그림이다.

3. 혈소판농축혈장의 조건배지(conditioned medium)의 제조

조골세포주를 100mm^{2}의 세포배양접시(cell culture dish: Falcon, Becton Dickinson, USA)에 80-90%로 충만해질 때까지 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 혈소판농축혈장에 의해 활성화된 조골세포주로부터 유리된 단백질이라 할 수 있다.

4. MTT 분석법을 이용한 세포증식분석(Cell proliferation assay)

조골세포주를 2×10^4 cells/mL의 농도로 96 well culture plate에 분주한 후 10% 어린 송아지 혈청이 포함된 DMEM/F-12 배지를 이용하여 세포를 34℃, 5% CO_2, 100% 습도의 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 세포 분주 후 6시간이 지나 세포

가 배양접시에 안착이 되면 어린 송아지 혈청이 포함되지 않은 DMEM으로 교체하여 12시간 동안 배양기에서 배양하였다. 이 후, 실험군에는 1ul/mL, 3ul/mL, 5ul/mL, 10ul/mL의 혈소판농축혈장과 1ul/mL, 3ul/mL, 5ul/mL, 10ul/mL의 혈소판농축혈장 조건배지를 첨가하였으며 세포 배양 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일째 되는 날 각각 MTT assay를 시행 하였다. MTT분석법은 노란색을 띠는 tetrazolium이라는 물질이 대사활동이 활발한 세포내에 존재하는 탈수소효소(dehydrogenase)에 의하여 갈색을 띠는 formazan이라는 물질로 전환되는 성질을 이용한 것으로 반응 후 형성된 formazan의 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. 실험배지에 MTT 분석시약을 각각 20uL를 첨가하고 34℃, 5% CO_2, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 2시간동안 배양한 후 490nm에서의 흡광도를 분광측정기(sphectrophotometer, GeneSecIII, Hitachi, Japan)를 이용하여 측정하였다.

5. Alkaline phosphatase specific activity 측정

세포배양을 시작한지 4일째 되는 날에 alkaline phosphatase activity를 측정하였다. Alkaline phosphatase(orthophosphoric monoester phosphohydrolase alkaline) activity는 pH 10.4에서 p-nitrophenylphosphate에서 유리되는 p-nitrophenol의 양을 분석함으로써 이루어진다. 20ul aliquot의 cell lysate를 200ul p-nitrophenylphosphate solution(NPP : Sigma, USA)에 첨가한다. 세포를 섭씨 37도의 0.1% Triton X-100/saline, 0.1M glycin-NaOH buffer 용액 속에 30분간 배양한다. 3M sodium hydroxide을 이용하여 반응을 중단시키고 405nm에서의 흡광도를 분광측정기를 이용하여 측정하였다.

6. 통계분석

각각의 실험은 5번씩 반복되었으며 각 실험에서 얻어진 흡광도의 값은 평균값을 표시하였다. 각 군간의 비교를 위해서 Student's t-test를 사용하였다. P값이 0.05이하인 경우에는 유의성 있는 차이가 있는 것으로 분석하였다.

Ⅲ. 연구성적

1. 혈소판농축혈장 농도에 따른 세포증식의 변화

Table 1과 fig. 9은 혈소판농축혈장의 농도를 달리하면서 1일, 2일, 3일, 4일, 5일이 경과한 후 측정한 흡광도 값의 변화를 보여주고 있다. 모든 실험군에서 시간에 따라 값이 증가, 4일째 최대 값을 보이다 5일째 감소되는 양상을 보였다. 아울러 혈소판농축혈장의 농도가 커질수록 세포증식이 증가하는 양상을 보였다.

Table 2는 각 실험군끼리의 통계분석을 위해 세포증식이 최고로 많이 증가한 4일째의 흡광도 값을 비교한 것이다. 농도가 1ul/mL를 제외한 모든 군에서 통계적으로 유의성 있는 세포증식의 증가가 관찰되었다($p<0.05$).

Table 1. The effect of platelet-rich plasma on the cell proliferation(O.D., n=5)

day	1	2	3	4	5
control	0.335	0.356	0.473	0.662	0.615
1ul/mL	0.447	0.448	0.571	0.758	0.683
3ul/mL	0.452	0.455	0.572	0.823	0.678
5ul/mL	0.514	0.456	0.604	0.885	0.574
10ul/mL	0.561	0.588	0.625	0.939	0.588

(O.D.: mean absorbance at 490nm, n: number of experiments, control: serum free DMEM)

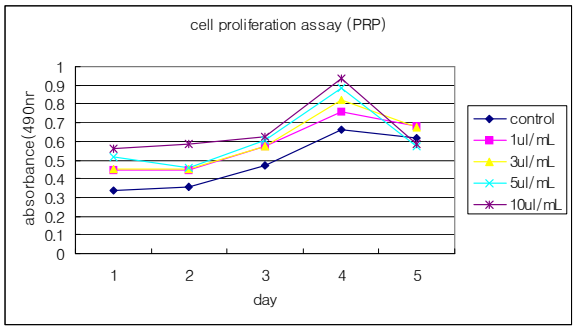

Fig. 9. The effect of platelet-rich plasma on the cell proliferation

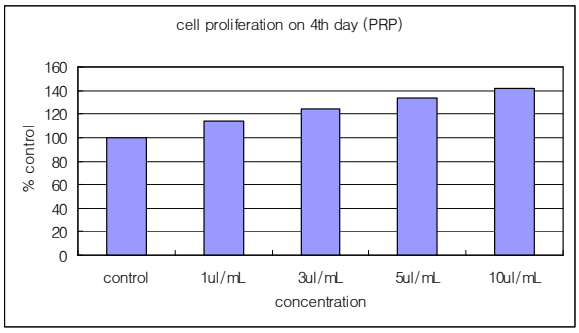

Fig. 10. Cell proliferation on 4th day(PRP)

Table 2. Cell proliferation on 4th day(PRP)

	O.D.	S.D.	% control
control	0.662	9.20E-02	100.00
1ul/mL	0.758	1.52E-01	114.51
3ul/mL	0.823*	1.43E-01	124.32
5ul/mL	0.885*	1.27E-01	133.69
10ul/mL	0.939*	1.36E-01	141.84

(*: P<0.05, t-test, significant difference compared to control group)

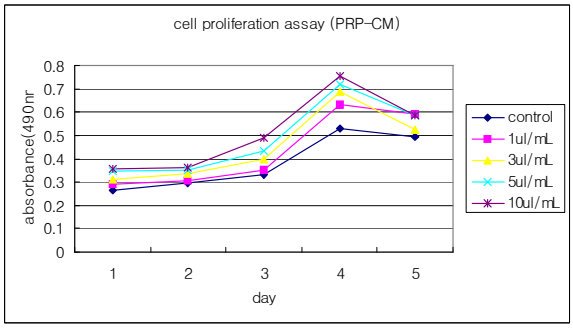

Fig. 11. The effect of conditioned medium on the cell proliferation

Fig. 10은 대조군을 100%로 설정하고 실험군의 값을 환산해서 그린 그래프이다. 혈소판농축혈장의 농도에 따라서 10ul/mL(41.84%), 5ul/mL(33.69%), 3ul/mL(24.32%), 1ul/mL (14.51%) 순으로 세포증식의 증가가 나타났다.

2. 혈소판농축혈장의 조건배지 농도에 따른 세포증식의 변화

Table 3, fig 11은 혈소판농축혈장의 조건배지 농도에 따른 세포증식의 변화를 보여주고 있다. 혈소

Table 3. The effect of conditioned medium on the cell proliferation(O.D., n=5)

day	1	2	3	4	5
control	0.265	0.293	0.331	0.532	0.494
1ul/mL	0.291	0.307	0.354	0.634	0.591
3ul/mL	0.309	0.337	0.399	0.688	0.523
5ul/mL	0.347	0.352	0.434	0.719	0.584
10ul/mL	0.357	0.362	0.487	0.753	0.585

(O.D.: mean absorbance at 490nm, n: number of experiments, control: serum free DMEM)

판농축혈장에서 보여준 바와 같이 시간이 지남에 따라 세포증식이 증가하고 있었으며 증가량상도 비슷하였다. 아울러 조건배지의 농도가 증가할수록 세포증식도 증가되었다.

Table 4는 혈소판농축혈장과 마찬가지로 통계분석을 위해 가장 세포증식이 많이 일어난 4일째의 흡광도 값을 비교한 것이다. 모든 군에서 통계적으로 유의성 있게 세포증식의 증가가 관찰되었다 ($p<0.05$).

Fig. 12는 대조군을 100%로 하고 실험군 값을 환산한 그림이다. 혈소판농축혈장군과 마찬가지로 조건배지의 농도의 증가에 따라 10ul/mL(41.54%), 5ul/mL(35.15%), 3ul/mL (29.32%), 1ul/mL(19.17%)순으로 세포증식이 증가하였다.

3. 혈소판농축혈장 농도에 따른 alkaline phosphatase activity의 변화

Table 5는 혈소판농축혈장을 1ul/mL, 3ul/mL, 5ul/mL, 10ul/mL의 농도로 첨가하였을 때 alkaline phosphatase 활동성의 변화된 값을 보여주고 있다. 모든 군에서 통계적으로 유의한 활동성의 증가가 관찰되었으며 혈소판농축혈장의 농도가 증가할수록 활동성도 높아졌다($p<0.05$).

Fig. 13은 대조군의 흡광도를 100%로 하고 환산한 실험군 값의 변화양상을 보여주고 있는 그래프이다. 혈소판농축혈장의 농도의 증가에 따라 10ul/mL(199.13%), 5ul/mL(135.65%), 3ul/mL(110.14%), 1ul/mL(55.94%)의 활동성의 증가가 관찰되었다.

4. 혈소판농축혈장의 조건배지 농도에 따른 alkaline phosphatase activity의 변화

Table 6은 혈소판농축혈장의 조건배지 농도를 1ul/mL, 3ul/mL, 5ul/mL, 10ul/mL로 달리하여 배지에

Table 4. Cell proliferation on 4th day(PRP-CM)

	O.D.	S.D.	% control
control	0.532	1.17E-01	100.00
1ul/mL	0.634*	1.62E-01	119.17
3ul/mL	0.688*	1.09E-01	129.32
5ul/mL	0.719*	1.67E-01	135.15
10ul/mL	0.753*	1.34E-01	141.54

(*: P<0.05, t-test, significant difference compared to control group)

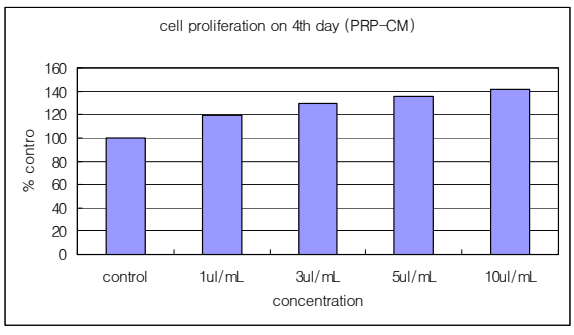

Fig. 12. Cell proliferation on 4th day(PRP-CM)

Table 5. The effect of platelet-rich plasma on the alkaline phosphatase activity(PRP, O.D., n=5)

	O.D.	S.D.	% control
control	0.345	1.30E-01	100.00
1ul/mL	0.538*	1.23E-01	155.94
3ul/mL	0.725*	1.28E-01	210.14
5ul/mL	0.813*	1.34E-01	235.65
10ul/mL	1.032*	9.60E-02	299.13

(O.D.: mean absorbance at 405nm,
n: number of experiments, control: serum free DMEM,
*: P<0.05, t-test, significant difference compared to control group)

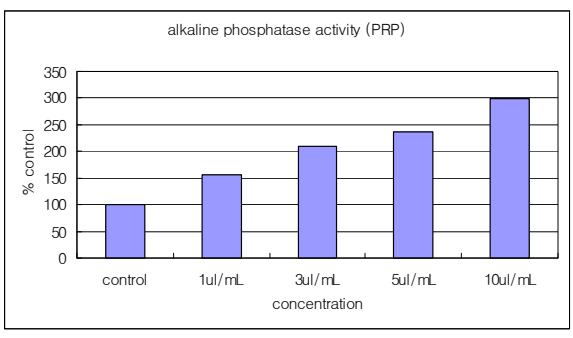

Fig. 13. Alkaline phosphatase activity(PRP)

Table 6. The effect of conditioned medium on the alkaline phosphatase activity (PRP-CM, O.D., n=5)

	O.D.	S.D.	% control
control	0.323	1.42E-01	100.00
1ul/mL	0.565*	1.33E-01	163.77
3ul/mL	0.643*	1.29E-01	186.38
5ul/mL	0.758*	1.49E-01	219.71
10ul/mL	0.953*	1.51E-01	276.23

(O.D.: mean absorbance at 405nm,
n: number of experiments, control: serum free DMEM,
*: P<0.05, t-test, significant difference compared to control group)

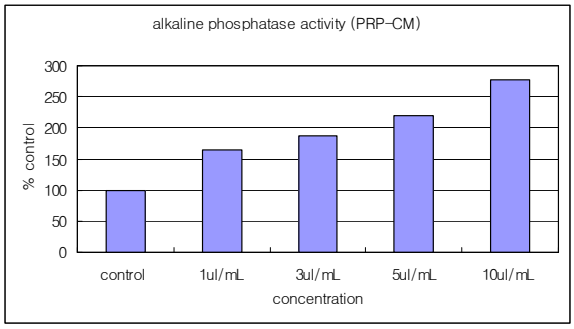

Fig. 14. Alkaline phosphatase activity(PRP-CM)

첨가하였을 때 측정된 alkaline phosphatase의 활동성의 변화를 보여주고 있다. 혈소판농축혈장과 마찬가지로 모든 군에서 통계적으로 유의한 활동성의 증가가 관찰되었다($p<0.05$).

Fig. 14는 대조군을 100%로 하고 환산한 실험군 값들을 비교한 것이다. 혈소판농축혈장군과 마찬가지로 농도의 증가에 따라 10ul/mL(176.23%), 5ul/mL(119.71%), 3ul/mL(86.38%), 1ul/mL(63.77%)의 활동성의 증가를 보였다.

Ⅳ. 토 의

기능적인 부하를 견뎌낼 수 있는 성공적인 골융합을 얻기 위해서는 임플랜트와 주변골 사이에 연조직의 개재없이 직접적인 골접촉이 일어나야 한다. 이런 골융합은 임플랜트가 식립 된 후 계면에서 일어나는 일반적인 골결손부의 창상치유과정을 통해서 얻어지게 되는데 크게 세단계로 진행된다. 첫 번째 단계로 조골세포가 골-임플랜트의 계면에 부착이 된다. 두 번째 단계로 부착된 조골세포의 증식이 일어난다. 세 번째 단계로 증식된 세포가 분화단계를 거치면서 골기질 단백질을 생산해 내고 이 골기질 단백질이 경화되면서 골조직이 생성된다. 이런 일련의 단계에서 중추적인 역할을 수행하는 것이 조골세포이다. 이에 많은 연구들은 치유속도 및 정도를 향상시키기 위해서 조골세포의 세포활성도를 높이는 방향으로 이뤄지고 있다.[1]

조골세포의 활성도를 높이기 위한 연구들을 살펴보면 Ong[2]등은 골생성을 직접 유도한다고 알려져 있는 bone morphogenetic proteins(BMPs)을 이용하여 조골세포의 세포활성도에 미치는 영향을 알아보았다. titanium disc상에서 BMP를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 alkaline phosphatase specific activity 및 osteocalcin 생성량에 대한 비교연구를 시행하였는데 BMP를 처리한 군에서 실험기간 내내 ALP의 높은 활동성과 유의성 있게 높은 osteocalcin의 생성양상이 관찰되었다고 보고 하였다. Moursi[3] 등은 두개봉합부의 발달에 중요한 역할을 한다고 알려진 fibroblast growth factor (FGF)를 쥐의 조골세포에 적용하였을 때 세포부착 및 증식을 증가시켰으며 두개골 기관배양(calvarial organ culture)에서 bFGF를 첨가한 경우에 봉합부의 조기 융합이 관찰되었다고 보고하였다. 아울러 bFGF를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 조골세포수의 변화를 관찰하였는데 4시간이 지난 후에 부착된 세포수는 큰 차이는 없었지만 3,5,7,14일이 지나 측정된 세포의 수에서는 현저한 차이가 관찰되었다고 보고하면서 이는 성장요소의 자극에 의한 조골세포의 증식능 향상에 의한 것이라고 언급하였다. Lian[4] 등은 vitamin D, glucocorticoid, TGF-β가 조골세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 osteocalcin의 생성량으로 비교 분석하였다. 이 연구에서 vitamin D는 조골세포의 분화정도에 따라서 세포의 활성을 다르게 조절하는데 분화초기인 세포에 투여한 경우에는 활성을 억제시켜 osteocalcin의 양을 감소시키지만 성숙된 세포에 투여된 경우에는 세포의 활성을 촉진시켜 osteocalcin의 생산을 현저히 증가시킨다고 보고

하였다.dexamethasone으로 대표되는 glucocorticoid를 투여한 경우에는 분화초기의 조골세포에게는 증식과 분화를 촉진, osteoclacin의 생성을 현저히 증가시키지만 성숙된 조골세포에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않는다고 하였으며 TGF-β는 세포의 증식을 촉진시키지만 분화를 억제하는 양상을 보여 osteocalcin의 생성을 억제한다고 보고하였다. 위와 같은 여러 형태의 단백질들이 세포의 활성에 기여한다는 보고 외에도 임플랜트의 표면성질이 세포활성에 영향을 미친다는 연구들도 많이 보고 되고 있다. Cooper[5]등은 서로 다른 표면형태를 가진 machined, titanium plasma-sprayed, titanium oxide grit-blasted surface 상에서 세포배양을 한 결과 같은 시기에도 서로 다른 골기질 단백질이 생성되는 것을 관찰하고 표면 형태가 조골세포의 분화양상에 영향을 끼친다고 보고하였다. Mustafa[6] 등은 machined surface와 다양한 입자 크기의 TiO_2로 blasting을 시행한 표면에서 세포의 활성도를 측정, 비교하였는데 거칠기가 클수록 세포의 DNA 합성의 증가를 나타내는 [^{3}H]-thymidine incorporation의 양이 커졌으며 세포의 분화의 척도인 osteocalcin의 생성량도 증가하였다고 보고 하였다. 혈소판농축혈장도 창상치유과정에서 세포의 치유능을 향상킨다는 것이 여러 임상보고를 통해 확인되고 있다.[7-11]

앞서 언급한 바와 같이 조골세포는 창상부위에서 부착, 증식, 분화의 일련의 단계를 거치면서 골형성을 하게 된다. 이전 논문[12]에서 혈소판농축혈장은 조골세포로 하여금 부착에 필요한 세포외기질 단백질인 fibronectin과 vitronectin등의 생성을 유도함으로써 세포부착을 증가시키며, 이 반응은 조골세포의 autocrine, paracrine 효과에 의해서 극대화된다는 것을 알 수가 있었다. 본 논문은 그 다음 단계인 증식과 분화과정에 있어서의 혈소판농축혈장의 영향을 알아보기 위해서 계획되었다. 증식과정은 세포배양을 5일 동안 시행, MTT 분석을 통해 비교 평가하였고 분화과정은 조골세포가 일련의 분화단계에서 생성하는 단백질을 측정해서 관찰하였다. 참고로 조골세포는 일련의 골형성 과정속에서 그 분화단계에 특이한 골기질 단백질을 생성해 낸다. 분화초기에는 일시적으로 collagen과 alkaline phosphatase가 나타나고 분화가 진행되어 가면서 bone sialoprotein과 osteocalcin이 나타난다. 골경화가 일어나는 시점에서는 osteopontin이라는 골기질 단백질을 나타낸다. 이렇게 분화단계에 따라 서로 다른 골기질 단백질을 분비하는 성질을 이용하면 조골세포의 분화정도를 측정할 수 있다.[13]

Table 1,2 와 fig.9,10은 혈소판농축혈장의 농도에 따른 세포증식의 변화를 보여주고 있다. 시간이 지나면서 대조군에 비해서 높은 세포증식을 관찰할 수 있었고 농도가 증가함으로써 세포증식도 상대적으로 증가하고 있는 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 혈소판농축혈장내에 조골세포의 증식에 직접적인 영향을 끼치는 특정요소들이 존재하고 있음을 말해준다. 혈소판농축혈장의 생물학적인 효과들을 보고하는 많은 논문[7,14]들은 혈소판내에 존재하는 여러 성장요소들의 역할에 주된 관심을 두고 있다. 성장요소들의 역할에 대해서 아직도 명확하게 밝혀지지는 않았지만 세포의 증식, 분화, 화학주성, 기질생성 등에 깊이 관여하고 있다고 알려져 있다.[15,16] 이러한 성장요소들을 다량 함유하고 있는 혈소판이 고농도로 농축되어 있는 것이 혈소판농축혈장이 대조군에 비해 높은 세포증식의 양상을 보이고 농도의 증가에 따라서도 세포증식의 증가를 가져오게 하는 원인인 것으로 생각된다. 참고로 Marx[17]등은 사람의 경우에 일반적으로 혈장에는 평균 200,000개/ul의 혈소판이 존재하지만 치료효과를 가지는 혈소판농축혈장에는 평균 1,000,000개/ul의 혈소판이 존재한다고 보고하였다.

Table 3,4 와 fig.11,12는 혈소판농축혈장의 조건배지를 이용하여 측정한 세포증식변화를 보여주고 있다. 혈소판농축혈장과 비슷한 증식의 증가양상을 보여주고 있다. 본 실험에서 제작된 조건배지는 혈소판농축혈장을 첨가한 배지에서 세포를 2시간 동안 배양한 후 혈장을 제거하고 혈청없는 배지에서 그 세포를 다시 24시간 동안 배양 한 후 채취하였는데 이 배지를 분석하면 세포의 증식이나 분화단계에 있어서 당시의 세포의 기능을 분석할 수 있다. 즉 혈소판농축혈장의 영향을 받은 세포들이 단백질을 제거한 배지에다 여러 단백질들을 생성,분비하게 되는데, 이런 단백질들을 분석하여 보면 특정세포의 분화단계에 있어서 세포가 어떤 물질들을 분비하고 있는지 확인할 수 있으며 또한 이러한 물질들이 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 끼치는지를 알 수가 있게 된다. 혈소판농축혈장과 그의 조

건배지가 조골세포의 증식에 대해서 비슷한 증가량과 양상을 보이는 것은 혈소판농축혈장내의 세포성장을 촉진시키는 단백질이 조골세포를 통해서 다시 이 단백질을 생성해 내도록 하여 세포의 증식을 촉진시키고 있다는 것을 말해준다. 즉 조골세포의 혈소판농축혈장에 대한 autocrine, paracrine 효과를 말해주고 있는 것이다. 이런 효과들은 창상치유과정에 관련된 세포들에게 치유능 향상 및 치유능의 지속성을 부여한다고 생각된다.

Table 5, fig. 13은 혈소판농축혈장을 첨가하였을 때 조골세포의 초기 분화단계를 나타내는 기질 단백질인 alkaline phosphatase 활동성의 변화를 보여주고 있다. 혈소판농축혈장의 농도가 증가함에 따라서 활동성도 증가하고 있음을 보여주고 있다. 이는 혈소판농축혈장 내의 단백질들이 단순히 세포의 증식만을 촉진시키는 것이 아니라 조골세포의 분화에도 관여하고 있음을 말해준다.

Table 6, fig. 14은 혈소판농축혈장의 조건배지에 의한 alkaline phosphatase의 활동성 변화를 보여주고 있다. 혈소판농축혈장을 투여한 경우와 비슷한 양상 및 증가량을 보이고 있다. 이는 증식과정과 마찬가지로 분화과정에서도 조골세포는 autocrine, paracrine 효과를 이용하여 세포들의 치유능의 향상과 지속성을 극대화 한다는 것을 말해주고 있다.

이상과 같은 결과들을 바탕으로 혈소판농축혈장이 조골세포의 증식, 분화과정을 촉진한다는 것을 알 수가 있었으며 아울러 조골세포의 autocrine, paracrine 효과에 의해서 이 효과가 더욱 더 극대화 된다는 것을 알 수가 있다.

Ⅴ. 결 론

본 논문은 세포배양실험을 통해서 골형성과정의 초기부착 이후의 단계인 증식 및 분화과정에서 혈소판농축혈장이 어떤 기전으로 조골세포에 영향을 미치는 지를 알아보고자 계획되었다. 5일동안의 세포배양을 통해서 혈소판농축혈장의 농도에 따른 조골세포주의 증식변화를 관찰하였고 혈소판농축혈장의 autocrine, paracrine효과를 알아보기 위해서 조건배지를 제작하여 혈소판농축혈장과 비교 평가하였다. 세포분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 alkaline phosphatase의 활동성을 혈소판농축혈장과 조건배지를 첨가하여 측정하였고, 이를 서로 비교평가하였다. 이후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈소판농축혈장의 농도가 증가할수록 세포증식은 증가하였다.
2. 혈소판농축혈장의 조건배지 농도가 증가할수록 세포증식은 증가하였으며 증가량과 증가 양상은 혈소판농축혈장군과 비슷하였다.
3. 혈소판농축혈장을 첨가하였을 때 조골세포주의 alkaline phosphatase 활동성의 증가양상 이 관찰되었다.
4. 혈소판농축혈장의 조건배지를 첨가하였을 경우에도 alkaine phosphatase의 활동성의 증 가양상이 관찰되었으며 증가량과 증가양상은 혈소판농축혈장군과 비슷하였다.

이상과 같은 결과를 통해서 혈소판농축혈장은 조골세포의 증식과 분화를 촉진시키며 이 반응은 조골세포의 autocrine, paracrine 효과에 의해서 더욱 더 극대화된다고 결론을 내릴 수 있다. 이는 혈소판농축혈장이 이전에 보고한 세포부착의 증진효과와 더불어 임플랜트 주변의 골형성과정을 촉진하여 골질이 좋지 않은 경우에도 보다 빠르고 양호한 골융합의 결과를 얻을 수 있음을 말해준다.

참 고 문 헌

1. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkila PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. Int J Oral Maxillofac Implants 1998;13:163-174.
2. Ong JL, Cardens HL, Cavin R, Carnes DL. Osteoblast responses to BMP-2-treated titanium in vitro. Int J Oral Maxillofac Implants 1997;12:649-54.
3. Moursi AM, Winnard PL, Winnard AV, Rubenstrunk JM, Mooney MP. Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. Cleft Palate-Craniofacial Journal 2002;39(5):487-496.
4. Lian JB, Stein GS. The developmental stages of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factor(TGF-β1) and hormones(vitamin D and glucocorticoid). J Oral Implantology 1993;19:95-105.

5. Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, Yliheikkila P, Felton DA. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. Int J Oral Maxillofac Implants 1999;14:37-47.
6. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determing optimal surface roughness of TiO_2 blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. Clin Oral Impl Res 2001;12:515-525.
7. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma : growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:638-646.
8. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1999 ;14:529-535.
9. Rosenberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma - initial case presentation. Pract Periodont Aesthet Dent 2000;12(9):843-850.
10. Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. Int J Periodontics Restorative Dent 2001;21:345-355.
11. de Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology - case reports. Int J Periodontics Restorative Dent 2000;20:487-497.
12. Jung TW, Jang KS, Kim CW, Kim YS. The effect of platelet-rich plasma on the cellular attachment of osteoblast cell line. J Korean Acad Stomatognathic Function and Occlusion 2003;19(4):282-290.
13. Cornet F, Anselme K, Grard T, Rouahi M, Noel B, Hardouin P, Jeanfils J. The influence of culture conditions on extracellular matrix proteins synthesized by osteoblasts derived from rabbit bone marrow. J Biomed Mater Res 2002;63:400-407.
14. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel : An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 1997;55:1294-1299.
15. Terranova VP, Wikesj UME. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. J Periodontol 1987;58: 371-380.
16. Kahn SN, Bostrom MPG, Lane JM. Bone growth factors. Orthop Clin North Am 2000;31(3):375-387.
17. Marx RE. Platelet-rich plasma(PRP): What is PRP and what is not PRP? Implant dentistry 2001;10(4):225-228.