

B-5. 혈소판 농축혈장이 조골세포의 초기부착 및 증식, 활성화에 미치는 영향

박상일^{1,*}, 김정근², 정진형¹, 임성빈¹

¹단국대학교 치과대학 치주과학교실

²단국대학교 치과대학 구강생화학교실

연구 목적

골조직이 손상된 곳을 재구성하기 위하여 여러 인공대체물들이 발전되어 왔으며, 그 중 in vivo 실험에서 calcium phosphate가 피막된 골대체체가 조골세포의 부착을 증진시킨다는 연구가 진행되어왔다. 그러나 in vitro에서 세포 수준의 연구가 미진하여 본 연구에서는 calcium phosphate가 피막된 배양접시에 혈액에서 분리한 혈청 및 혈소판이 풍부한 혈장 (platelet rich plasma, PRP)을 부착하여 부착된 성장인자의 양을 확인한 후, 조골세포의 초기 부착, 조골세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

연구재료 및 방법

1. 혈액 채취 원심분리 혈장 혈액성분 분리

300g 내외의 흰쥐를 rumpun과 ketamin으로 마취하고 heart puncture를 시행하여 혈액 10 ml를 채취하여 2000xg의 원심력으로 3분 원심 분리하여 혈청부분을 분리하고, 5000xg의 원심력으로 5분 원심 분리하여 혈소판이 풍부한 혈장을 분리하였다.

2. 혈소판 계수

채취한 혈청과 PRP부분을 각각 hemocytometer를 이용하여 혈소판을 계수하였다.

3. PDGF-BB의 부착량 측정

Calcium phosphate가 피막된 96-well plate에 혈청과 PRP를 각각 5, 10 및 30 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척한 후 2.5N acetic acid로 성장인자를 회수하여 enzyme immunoassay 방법으로 PDGF-BB의 부착정도를 측정하였다.

4. TGF- β 의 부착량 측정

Calcium phosphate가 피막된 96-well plate에 혈청과 PRP를 각각 5, 10 및 50 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척한 후 2.5N acetic acid로 성장인자를 회수하고 2.7N NaOH / 1M HEPES로 중화시킨 후 enzyme immunoassay 방법으로 TGF- β 의 부착정도를 측정하였다.

5. 조골세포의 배양

사람과 백서 조골세포주인 HOS와 ROS 17/2.8 세포를 통상적인 방법에 의해 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 포함된 DMEM 배양액에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하고 일주일 간격으로 1 : 10으로 계대배양하였다. 배양시 온도는 37 $^{\circ}$ C, 습도는 95%를 유지하고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다.

6. 조골세포의 세포 부착도 측정

Calcium phosphate가 피막된 48-well plate에 혈청과 PRP를 각각 100 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산

완충생리식염수로 세척하고, HOS와 ROS 17/2.8세포를 10^4 cells/well이 되도록 혈청이 없는 DMEM 배양액으로 세포현탁액을 만들어 plate에 분주한 후 1시간 및 4시간동안 부착시켰다. 시간이 경과한 후 세포를 고정하고 1% toluidine blue 용액으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

7. 조골세포의 세포증식도 검사

Calcium phosphate가 피막된 48-well plate에 혈청과 PRP를 각각 $100 \mu\text{L}$ 씩 3시간 부착시킨 후 인산 완충생리식염수로 세척하고, HOS와 ROS 17/2.8세포를 8×10^4 cells/well로 되도록 0.4% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 세포현탁액을 만들어 plate에 분주한 후 48시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 hemocytometer를 이용하여 세포를 계수하여 세포증식도를 검사하였다.

8. 염기성인산분해효소 활성측정

Calcium phosphate가 피막된 96-well plate에 혈청과 PRP를 각각 $30 \mu\text{L}$ 씩 3시간 부착시킨 후 인산 완충생리식염수로 세척하고, HOS와 ROS 17/2.8세포를 5×10^3 cells/well로 되도록 0.4% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 세포현탁액을 만들어 plate에 분주한 후 48시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Triton X-100/saline으로 30분 동안 세포를 처리한 후, 세포처리액의 일정량을 기질인 100 mM PNPP의 존재하에 glycine-NaOH 완충액 (pH 10.4)과 함께 37°C 에서 30분간 반응시켜 기질인 PNPP로부터 유리되어 나온 PNP의 양을 405 nm에서 비색정량하였다.

9. 통계

본 실험의 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준 오차로 나타내었다.

결론

1. 혈액성분 중 분리된 혈청과 PRP부분의 혈소판을 계수한 결과 $1 \mu\text{L}$ 당 들어있는 평균 혈소판개수는 혈청내 177003개 PRP내 1656062개로 PRP내의 혈소판이 약 9배정도 높게 나타났다.
2. PDGF-BB는 calcium phosphate가 피막된 plate에 혈청 및 PRP의 양에 비례하여 높게 부착하였으나 TGF- β 는 $50 \mu\text{L}$ 의 PRP를 처리한 경우에만 높게 부착되었다.
3. 혈청과 PRP를 3시간 부착시킨 후 HOS와 ROS17/2.8 세포를 1시간, 4시간동안 부착시킨 결과, 두 세포 모두 혈청만을 부착시킨 경우 1시간 및 4시간 동안 부착한 경우 대조군에 비해 큰 차이가 없었으며, PRP를 부착시킨 경우 1 시간 및 4시간 경과 후 대조군에 비해 현저히 세포의 부착이 증가되었다.
4. 혈청과 PRP를 3시간 부착시킨 후 HOS와 ROS17/2.8 세포를 48시간 배양한 경우, 세포증식이 현저히 증가되었다.
5. 혈청과 PRP를 3시간 부착시킨 후 HOS와 ROS17/2.8 세포를 48시간 배양한 경우, 염기성인산분해효소의 활성이 현저히 증가되었다.