

혈소판 농축혈장이 조골세포의 초기부착과 증식 및 활성화에 미치는 생물학적 영향

박상일¹ · 정진형¹ · 임성빈¹ · 김정근²

¹단국대학교 치과대학 치주과학교실, ²구강생화학교실

I. 서론

손상된 골 결손부의 재생을 위하여 여러 이식재료가 발전되었으며 이러한 골 이식재의 기본 형태로는 자가골, 동종골, 이종골 및 합성골이 있다¹⁾.

골 이식재의 모든 요건을 구비했다고 여겨지는 자가골은 골발생, 골유도, 골전도 세 가지 기전 모두를 이용하여 새로운 골을 형성하나 이차적 수술 부위가 필요하고, 구강 내에서는 충분한 양을 확보할 수 없으며, 치근흡수 등의 단점이 있다^{2,5)}.

동종골은 동결, 동결건조, 탈회동결건조 및 방사선 조사를 한 골로 골 발생능력은 없는 이식재료이다. 공여부는 불필요하고, 충분한 양을 공급받을 수 있다는 점에서 자가골의 단점을 보완하고 있으나¹⁾, 다른 개체의 조직을 사용함으로써 질병 전염의 가능성이 논란이 되고 있고, 숙주의 면역기능에 의한 거부반응이 보고되기도 한다. 또한 제작한 조직은행 간에 효능 차이가 심하다⁶⁾고 보고되고 있다.

합성골의 경우 다양한 구조나 크기 및 형태로 제작되어 공급되고 있으며, 일반적으로 사용되거나 연구되고 있는 합성골로는 합성 인산칼슘 세라믹, 탄산칼슘, 생체 활성 유리 등이 있다. 특히 calcium phosphate는 정형외과와 치과에서 널리 사용되는 골 대체재료로 brushite, 수산화인회석, 무정형 calcium

phosphate 등으로 세분할 수 있다⁷⁾. Higashi⁸⁾ 나 Yoshimine⁹⁾ 등은 calcium phosphate에서 골세포가 더 잘 견딜 수 있고, 서로 다른 골단백질 생산을 증진시킨다는 연구를 보고한 바 있다.

한편 최근 골 결손부의 재생을 더 빠르고, 성숙된 골질을 얻기 위한 방법의 하나로 성장인자를 이용한 치료법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다^{10,11)}. 골재생과 관련된 성장인자 중 PDGF, TGF- β , IGF 등이 가장 많이 존재하는 조직은 혈소판이라 알려져 있으며, 이러한 성장인자는 낮은 농도에서는 골재생에 효과가 없고 높은 농도에서 골재생을 촉진한다고 보고되고 있다¹²⁾. Tayapongsak 등¹³⁾은 하악 재건술 시에 자가 피브린 접착제(autologous fibrin adhesive)를 해면골에 첨가해 방사선학적으로 더 빨리 골의 강화(consolidation)가 일어나는 것을 확인하였고, Marx 등¹⁴⁾은 혈소판을 농축해서 사용하는 방법에 대해 보고하고 혈소판 농축 혈장을 임상에 사용하였을 때 임상적, 방사선학적 그리고 조직학적으로 골 형성과 골 밀도가 증가되는 것을 보고하였다. 뿐만 아니라 혈소판 농축 혈장은 발치와¹⁵⁾, 상악동 거상술¹⁶⁾, 치조제 증대술¹⁷⁾, 치조제 확장술¹⁸⁾ 등에서 사용 시에도 이식재가 더 빨리 안정화되고 골유착이 더 완전하게 일어남이 관찰되었다.

혈소판에서 확인된 성장인자로는 혈소판 유래 성

장인자(PDGF), 전환 성장인자- β (TGF- β), 인슐린 유사 성장인자-I(IGF-I)등이 있다. 혈소판 유래 성장인자는 다공성의 골 이식재와 결합하여 조골세포와 기질간의 결합 및 세포증식을 증가시키며¹⁹⁾, 세포의 유사분열과 섬유아세포와 조골세포의 기능의 증진, 대식세포와 같은 다른 세포의 성장인자의 촉진에 중요한 역할을 하는 것^{14,20)}으로 알려져 있다. 골형태형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein, BMP)의 superfamily인²¹⁾ 전환 성장인자- β 는 결합조직의 치유와 골 재생에 관여하는 성장분화 요소로서 조골세포들에 대한 화학 주성을 증가시키고 세포분열을 유도하며, 파골세포 형성과 골흡수를 방해하여 골형성을 유리하게 한다²²⁻²⁵⁾고 밝혀졌다.

현재 혈소판 농축 혈장의 효과에 관한 임상 결과보고 및 성장인자 각각에 관한 세포수준에서의 연구는 있었으나, 혈소판 농축 혈장 자체에 관한 세포수준에서의 연구는 거의 없었다. 이에 calcium phosphate가 피막된 배양접시에 혈소판 농축 혈장을 부착하여 부착된 성장인자의 양을 확인한 후, 혈소판 농축 혈장이 조골세포의 초기 부착과 조골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향을 평가해 보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 혈액 채취 및 혈소판 농축 혈장의 제조

체중 300 g 내외의 전신적 질환이 없는 건강한 백서 9마리를 Ketamine HCl(0.1 ml/kg)과 Xylazine HCl(Rompun[®], 한국 바이엘, 0.1 ml/kg)로 전신마취하고 heart puncture를 시행하여 혈액 10 ml를 채취하였다. 채취 시 0.01 cc의 헤파린이 들어있는 주사기를 이용하여 혈액의 응고를 방지하였다. 채취된 혈액을 Placon[®] (OCT Inc., Korea)을 이용하여 3분 동안 2000 G의 원심력으로 원심분리하여 상층의 혈장과 하층의 적혈구층으로 나뉘면 상층만 분리하여 다시 5분간 5000 G의 원심력으로 원심분리하였다. 최상층에 혈장이 모이고 중층에 buffy coat, 최하층에 다시 여분의 적혈구가 남게 되는데, 최상층의 혈장과 여분의 적혈구를 제외한 상층의 혈소판 농축

혈장층 1 ml와 1차 원심분리후 상층의 혈청을 실험에 이용하였다.

2. 혈소판 계수

채취한 혈청과 혈소판 농축 혈장부분을 각각 hemocytometer(Sigma, USA)를 이용하여 혈소판을 계수하였다.

3. PDGF-BB의 부착량 측정

Calcium phosphate가 피막된 96-well plate의 OAAST[™](OCT Inc., Korea) 배양접시에 혈청과 혈소판 농축 혈장을 각각 5, 10 및 30 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척한 후 2.5 N acetic acid로 성장인자를 회수하여 enzyme immunoassay kit (Human PDGF-BB immunoassay kit, Quantikine[®], R&D system, USA)를 이용하여 PDGF-BB의 부착 정도를 측정하였다.

4. TGF- β 의 부착량 측정

Calcium phosphate가 피막된 96-well plate에 혈청과 혈소판 농축 혈장을 각각 5, 10 및 30 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척한 후 2.5 N acetic acid로 성장인자를 회수하고 2.7 N NaOH / 1 M HEPES로 중화시킨 후 enzyme immunoassay kit(Human TGF- β immunoassay kit, Quantikine[®], R&D system, USA)를 이용하여 TGF- β 의 부착 정도를 측정하였다.

5. 조골세포의 배양

조골세포의 배양은 사람과 백서 조골세포주인 HOS (Human Osteosarcoma Cell)와 ROS 17/2.8 (Rat Osteosarcoma Cell 17/2.8) 세포를 통상적인 방법에 의해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco Co., USA)과 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Amphotericin B 25 μ g/ml, Gibco Co., USA)가 포함

된 Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM, Gibco Co., USA) 배양액에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하고 일주일 간격으로 1 : 10의 비율로 계대 배양하였다. 배양시 온도는 37°C, 습도는 95%를 유지하고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다.

6. 조골세포의 세포 부착도 측정

Calcium phosphate가 피막된 48-well plate에 혈청과 혈소판 농축 혈장을 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였으며, 혈청과 혈소판 농축 혈장을 첨가한 경우를 실험군으로 하였다. 실험군에서는 혈청과 혈소판 농축 혈장을 각각 100 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척하고, HOS와 ROS 17/2.8 세포를 10⁴ cells/well이 되도록 혈청이 없는 DMEM 배양액으로 세포현탁액을 만들어 배양접시에 분주한 후 1시간 및 4시간동안 부착시켰다. 시간이 경과한 후 세포를 3.7% formalin 용액으로 고정하고 1% toluidine blue 용액으로 염색하여 광학현미경(Olympus Co, Japan)하에서 관찰하였다.

7. 조골세포의 세포증식도 검사

Calcium phosphate가 피막된 48-well plate에 혈청과 혈소판 농축 혈장을 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였으며, 혈청과 혈소판 농축 혈장을 첨가한 경우 실험군으로 하였다. 실험군은 혈청과 혈소판 농축 혈장을 각각 100 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척하고, HOS와 ROS 17/2.8 세포를 8×10⁴ cells/well로 되도록 0.4% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 세포현탁액을 만들어 배양접시에 분주한 후 48시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 hemocytometer를 이용하여 세포를 계수하여 세

포증식도를 검사하였다.

8. 염기성인산분해효소 활성측정

Calcium phosphate가 피막된 96-well plate에 혈청과 혈소판 농축 혈장을 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였으며, 혈청과 혈소판 농축 혈장을 첨가한 경우 실험군으로 하였다. 실험군은 혈청과 혈소판 농축 혈장을 각각 30 μ 씩 3시간 부착시킨 후 인산완충생리식염수로 세척하고, HOS와 ROS 17/2.8 세포를 5×10³ cells/well로 되도록 0.4% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 세포현탁액을 만들어 배양접시에 분주한 후 48시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Triton X-100/saline으로 30분 동안 세포를 처리한 후, 세포처리액의 일정량을 기질인 100 mM PNPP(p-nitrophenyl phosphate, Sigma, USA)의 존재 하에 glycine-NaOH 완충액 (pH 10.4)과 함께 37°C에서 30분간 반응시켜 기질인 PNPP로부터 유리되어 나온 PNP의 양을 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 405 nm에서 비색정량하였다.

9. 통계처리

본 실험의 통계처리는 Student's *t* test를 이용하였으며, 값은 평균과 표준편차로 나타내었다.

III. 연구 결과

1. 혈소판 계수

혈장과 혈소판 농축 혈장 1 μ 에 들어있는 혈소판의 수는 혈장에서 평균 177,003±29,976 개였으며 혈소판 농축 혈장에서는 평균 1,656,062±661,041 개로 혈장에서보다 약 9배 많이 계수 되었다(Table 1).

Table 1. The Number of platelet in 1 μ g at serum and PRT (cell/ μ g, mean \pm S.D.)

	Serum (n=9)	PRP (n=9)
Platelet Count	177,003 \pm 29,97	1,656,062 \pm 661,041

2. PDGF-BB의 부착량 측정

혈청과 혈소판 농축 혈장을 5 μ 씩 3시간 부착시킨 calcium phosphate가 피막된 배양접시에서 각각 156.1 ± 25.50 ng/ml와 157.4 ± 0.65 ng/ml가 부착되었지만 두 군간 유의한 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.01$)(Table 2, Figure 1).

10 μ 씩 부착시킨 배양접시에서는 각각 151.0 ± 8.50 ng/ml와 212.9 ± 1.45 ng/ml가 부착되었고 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ($p < 0.01$)(Table 2, Figure 1).

30 μ 씩 부착시킨 배양접시에서 각각 214.2 ± 24.00 ng/ml와 259.4 ± 10.70 ng/ml가 부착되었고 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ($p < 0.01$)(Table 2, Figure 1).

3. TGF- β 의 부착량 측정

혈청과 혈소판 농축 혈장을 5 μ 씩 3시간 부착시킨 calcium phosphate 피막된 배양접시에서 부착된 TGF- β 는 전혀 관찰되지 않았다(Table 3, Figure 2).

10 μ 씩 부착시킨 경우 혈청을 부착시킨 군에서는 TGF- β 가 부착되지 않은 반면 혈소판 농축 혈장 부착 군에서는 394.4 ± 42.00 ng/ml가 부착되었고 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ($p < 0.01$)(Table 3, Figure 2).

혈청과 혈소판 농축 혈장을 30 μ 씩 부착시킨 배양접시에서는 각각 212.0 ± 4.50 ng/ml와 2646.1 ± 173.00 ng/ml가 부착되었고 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었다($p < 0.01$)(Table 3, Figure 2).

Table 2. Distribution of the resected roots in maxillary and mandibular arches

Amount(μ /well)	PDGF-BB (n=32)	
	Serum	PRP
5	156.1 ± 25.50	157.4 ± 0.65
10	151.0 ± 8.50	$212.9 \pm 1.45^{**}$
30	214.2 ± 24.00	$259.4 \pm 10.70^{**}$

** : Significantly different from serum group ($p < 0.01$)

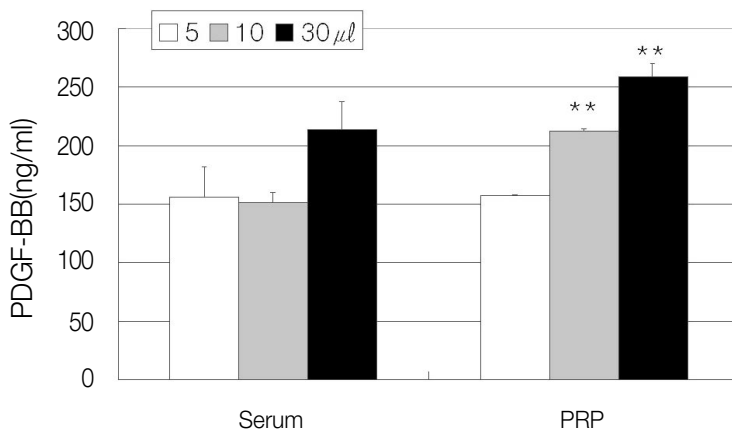


Figure 1. Binding amount of PDGF-BB in serum and PRP at Ca-P coated plate

Table 3. Binding amount of TGF- β in serum and PRP at Ca-P coated plate (ng/ml, mean \pm S.D.)

Amount (μ l/well)	TGF β (n=32)	
	Serum	PRP
5	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00
10	0,0 \pm 0,00	394,4 \pm 42,00**
30	212,0 \pm 4,50	2646,1 \pm 173,00**

** : Significantly different from serum group (p<0,01)

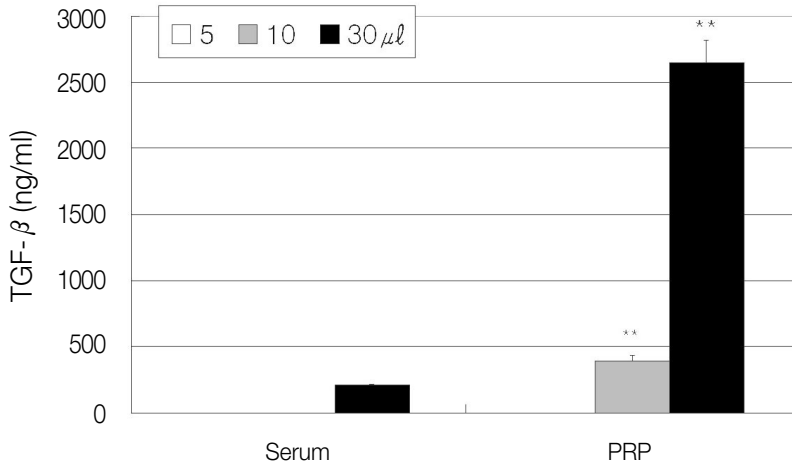


Figure 2. Binding amount of TGF- β in serum and PRP at Ca-P coated plate

4. 조골세포의 세포 부착도 측정

혈청과 혈소판 농축 혈장 100 μ l를 calcium phosphate가 피막된 배양접시에 각각 3시간 부착시킨 후 1시간 동안 HOS 세포를 부착시킨 경우 혈청을 부착시킨 군은 대조군과 유사하나 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군은 대조군과 비교하여 현저히 증가된 양상을 보였다(Figure 3, 4, 5).

4시간 동안 HOS 세포를 부착시킨 경우도 1시간

경과 후의 결과와 유사한 모습이 관찰되었다(Figure 6, 7, 8).

1시간 동안 ROS 17/2.8 세포를 부착시킨 경우 역시 혈청을 부착시킨 군은 대조군과 유사하나 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군은 대조군과 비교하여 현저히 증가된 양상을 보였다(Figure 9, 10, 11).

4시간 동안 ROS 17/2.8 세포를 부착시킨 경우 1시간 경과 후의 결과와 유사한 모습이 관찰되었다(Figure 12, 13, 14).

Table 4. Effect of serum and PRP on the proliferation of HOS and ROS 17/2.8 cells

	HOS (n=16)	ROS 17/2.8 (n=16)
Control	2,50 \pm 0,32	6,45 \pm 0,68
Serum	9,95 \pm 0,94**	8,90 \pm 0,89*
PRP	11,20 \pm 0,82**	8,60 \pm 0,66*

* : Significantly different from control group (p<0,05)

** : Significantly different from control group (p<0,01)

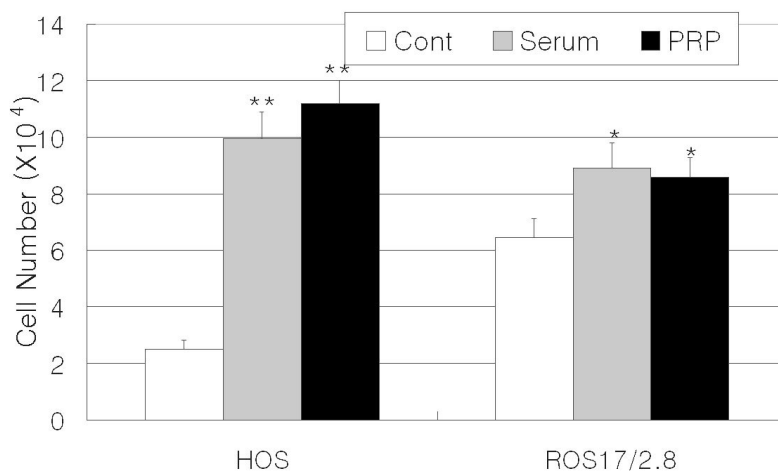


Figure 15. Effect of serum and PRP on the proliferation of HOS and ROS 17/2,8 cells

Table 5. Effect of serum and PRP on the ALP activity of HOS and ROS 17/2,8 cells

	HOS (n=16)	ROS 17/2,8 (n=16)
Control	0,028±0,002	1,172±0,034
Serum	0,036±0,006	2,052±0,088**
PRP	0,056±0,005**†	2,140±0,152**

** : Significantly different from control group (p<0,01)

† : Significantly different from serum group (p<0,01)

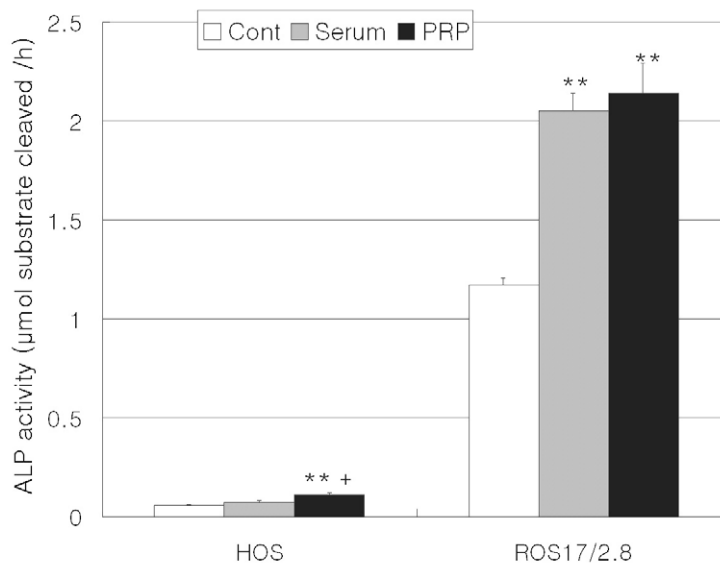


Figure 16. Effect of serum and PRP on the ALP activity of HOS and ROS 17/2,8 cells

5. 조골세포의 세포 증식도 검사

혈청과 혈소판 농축 혈장 100 μ l를 calcium phosphate가 피막된 배양접시에 각각 3시간 부착시킨 후 48시간 동안 HOS 세포를 배양시킨 경우 대조군에서는 $2.50 \pm 0.32 \times 10^4$ 개, 혈청을 부착시킨 군에서는 $9.95 \pm 0.94 \times 10^4$ 개, 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군에서는 $11.20 \pm 0.82 \times 10^4$ 개로 대조군에 비해 혈청을 부착시킨 군과 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군 모두에서 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였으나($p < 0.01$), 혈청군과 혈소판 농축 혈장군 간에는 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았다($p > 0.01$)(Table 4).

6. 염기성 인산 분해효소 활성측정

혈청과 혈소판 농축 혈장 30 μ l를 calcium phosphate가 피막된 배양접시에 각각 3시간 부착시킨 후 48시간 동안 HOS 세포를 배양시킨 경우 대조군에서는 $0.028 \pm 0.002 \mu\text{mol}$, 혈청을 부착시킨 군에서는 $0.036 \pm 0.006 \mu\text{mol}$, 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군에서는 $0.056 \pm 0.005 \mu\text{mol}$ 로 대조군과 혈청을 부착시킨 군간에는 유의성 있는 증가가 없었지만($p > 0.05$), 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군은 대조군이나 혈청을 부착시킨 군에 비해 둘 다에서 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.01$)(Table 5, Figure 16).

48시간동안 ROS 17/2.8 세포를 배양시킨 경우에는 대조군에서 $1.172 \pm 0.034 \mu\text{mol}$, 혈청을 부착시킨 군에서는 $2.052 \pm 0.088 \mu\text{mol}$, 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군에서는 $2.140 \pm 0.152 \mu\text{mol}$ 로 대조군에 비해 혈청을 부착시킨 군과 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군 모두에서 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.01$)(Table 5, Figure 16).

V. 총괄 및 고찰

PDGF는 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포의 증식을 촉진시키고²⁶⁾ 치주인대세포에 적용했을 경우 세포증식, 화학주성 및 교원질합성을

증가시키며²⁷⁾, 사람의 치주인대세포에 주된 유사분열 촉진인자로 작용한다²⁸⁾. 혈소판 내에 가장 많이 함유된 PDGF가 PDGF-AB임에도 불구하고²⁹⁾ 본 연구에서 PDGF-BB만을 측정된 이유는 골유래세포 배양시 PDGF-BB를 첨가한 경우 세포의 증식률이 촉진되었다는 Piche와 Graves³⁰⁾의 연구와 Lynch 등³¹⁾이 생체실험에서 PDGF-BB를 단독으로 치주 결손부에 적용하였을 때 신생 치조골과 신생 백악질의 형성을 자극할 수 있다는 보고에 근거를 두고 있다. 또한 동물 세포에는 PDGF의 A사슬이나 B 사슬 모두가 결합할 수 있는 PDGF receptor α -subunit보다 PDGF의 B 사슬만이 결합할 수 있는 PDGF receptor β -subunit가 훨씬 많이 존재하며 receptor β -subunit가 세포의 유사분열 등에 미치는 영향이 더 커서 PDGF-AA나 -AB 보다 PDGF-BB에 대한 세포의 반응이 더 크게 나타나기 때문³²⁾에 PDGF-BB를 측정하였다.

정상적인 인체 조골세포에는 TGF- β 의 수용기가 존재하는데, TGF- β 는 골유래세포에서 분열 유발인자로 작용하며³³⁾, 조골세포에 대한 화학 주성을 유발하고^{34,35)}, 시험관 실험에서는 조골세포의 교원질 생산 능력을 향상시키고 동시에 유사분열을 일으킨다³⁶⁾. TGF- β 를 창상에 국소적으로 도포하였을 경우 창상부위의 인장강도를 증가시키고, 섬유아세포와 대식세포를 끌어들이고, 교원질의 침착을 증가하는 결과³⁷⁾가 보고되기도 하였다. Heine 등³⁸⁾은 면역 조직 화학 검사로 TGF- β_1 이 연골이나 골을 형성 중인 연골아세포, 조골세포, 파골세포에서 관찰됨을 보고하였다. Noda와 Camilliere 등³⁹⁾은 TGF- β 를 골막 상방이나 골막 직하방에 반복 주사하여 신생골이 형성됨을 관찰하였다. 하지만 TGF- β 는 창상 치유 과정 중 세포 증식에 있어서 다양한 기능을 나타내어 세포마다 또는 같은 세포에서도 실험실적 조건의 차이에 따라서 세포증식을 촉진시키거나 혹은 억제시킨다⁴⁰⁾.

PDGF와 TGF- β 를 혼합하여 사용한 연구들을 살펴보면 Oates 등²⁸⁾은 TGF- β 가 PDGF의 유사 분열성 반응에 대한 조절인자로 작용한다고 하였고 Loeff⁴¹⁾와 Battagay 등⁴²⁾이 이를 뒷받침 하였다. 또한 TGF- β_1 단독 혹은 TGF- β_1 과 PDGF를 혼합하여 사용한 경우

치는 섬유아세포에서보다 치주인대 세포에서 더 많은 세포증식이 있었던 반면 PDGF를 단독으로 사용한 경우 치주인대 세포보다 치은 섬유아세포의 증식을 더 많이 일으키는 것이 관찰되었다⁴³⁾. 쥐 두개골을 이용한 골기질 침착 실험에서 0.1 nM에서 10 nM (250 ng/ml)까지의 TGF- β 는 용량 의존적으로 증가하는 양상을 보였고 PDGF도 1 nM에서 10 nM (320 ng/ml)까지는 용량 의존적 증가 양상을 보였다³⁵⁾.

골조직의 재생에서 사용되는 이식재에 대한 세포의 부착은 세포의 성장, 이주 및 분화의 기본적인 과정으로 골조직과 이식재의 계면형성은 조골세포와 이식재의 직접적인 상호작용에 영향을 받는다. 그러므로 조골세포의 부착은 골조직과 이식재의 상호작용에 필수적인 요소이다.

이식재 중 하나인 합성골 대체물은 골형성의 골격으로 작용하며 잔존 이식 대체물이 없이 새로운 신생골로 대체되기 위해 비교적 빠른 흡수성을 가져야 한다. 또한 생체재료의 생리화학적 표면특성이 세포와의 상호작용에 커다란 영향을 준다⁴⁴⁻⁴⁹⁾.

Bioactive glass에 calcium phosphate와 혈청 단백질을 이중으로 코팅하였을 때 염기성 인산 분해효소의 활성이 상승하였으며 calcium phosphate가 포함된 층이 조직배양액으로부터 단백질을 농축시키고, 조골세포가 mineralized extracellular matrix를 형성하는데 이를 이용한다고 알려져있다⁵⁰⁾.

Marx⁵¹⁾는 44명 환자의 말초 혈액을 농축한 결과 machine counter를 사용하였을 때 338%의 혈소판 농축을 보였으나 혈액 도말층(blood smear) 상의 혈소판을 똑같은 확대로 세었을 때 혈소판 농축 혈장이 900% 증가된 것을 보고하였는데, 이번 연구에서 백서의 혈소판을 hemocytometer로 계수한 결과 혈소판 농축 혈장 내의 혈소판 수가 혈청 내의 혈소판 수 보다 약 9배 많이 계수되어 Marx의 연구와 유사한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 하지만 연구 결과, 오차 범위가 크게 발생하였는데 Marx의 경우 세포 분리기인 Electro-medics[®] 500(Medtronics Inc., USA)를 사용한 반면 본 연구에서는 원심 분리기와 피펫을 이용한 수작업으로 혈소판 농축 혈장층을 분리해냈기 때문인 것으로 보여진다.

PDGF-BB와 TGF- β 의 부착량은 혈소판이 활성화되어 α -granule이 방출되어야 측정가능한데 이는 혈장과 혈소판 농축 혈장에 트롬빈과 칼슘을 첨가함으로써 가능하였다. 또한 부착량 측정 결과로 대체로 농도 의존적으로 증가하는 양상을 관찰할 수 있었지만 TGF- β 측정시 5 μ /well, 10 μ /well의 혈청을 첨가한 경우와 5 μ /well의 혈소판 농축 혈장을 첨가한 경우 검출되지 않음을 볼 수 있었는데 이는 enzyme immunoassay kit가 30pg/ml이하의 양은 검출할 수 없기 때문인 것으로 사료된다.

조골세포의 세포 부착도 측정에서 시간에 관계없이 혈청군은 대조군과 유사한 부착도를 나타내었으나 혈소판 농축 혈장군은 혈청군과 비교하여 현저히 증가된 양상을 보였으며 이는 Howell 등¹²⁾이 낮은 농도의 혈소판 유래인자와 인슐린 유사성장인자의 사용은 골 재생에 효과가 없으며 높은 농도에서 골 재생을 촉진시킨다고 보고한 내용과 일치한다. 하지만 세포 부착도를 통계처리하는데 어려움이 있었는데 이는 부착된 조골세포들 대부분이 엉겨붙어 존재하여 조골세포를 계수하는 것이 불가능했기 때문이었다. 같은 배율로 측정된 사진상의 조골세포 면적을 비교하는 방법도 있으나 이 역시 조골세포가 겹쳐져 있는 경우가 많아 정확치 않으므로 의미를 둘 수 없었다. 세포 부착도를 통계처리하기 위해서는 다른 방향에서의 접근이 시도되어야 할 것으로 사료된다.

조골세포의 세포 증식도에 대한 혈청과 혈소판 농축 혈장의 영향을 관찰한 결과 대조군에 비해 혈청과 혈소판 농축 혈장 모두에서 세포 증식도가 증가되었고 혈청군과 혈소판 농축 혈장군간의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. Canalis⁵²⁾, Oates 등²⁸⁾은 PDGF-BB의 농도가 증가함에 따라 세포의 DNA 합성능이 증가함을 보고하였고, 정 등⁵³⁾은 PDGF-BB의 농도가 20 ng/ml일 때, Blom 등⁵⁴⁾은 PDGF 농도가 50 ng/ml일 때 가장 DNA 합성이 활발하고, 최적의 유사분열 유발농도는 0.1-15 ng/ml라고 보고하였는데 본 연구에서 PDGF의 부착농도는 혈청군과 혈소판 농축 혈장군 모두 200 ng/ml이상으로 측정되었고 세포 증식도 역시 대조군에 비해 모두 증가하였기

때문에 앞선 연구들의 결과와 다르지 않음을 확인할 수 있었다.

조골세포의 활성도를 나타내는 생화학적 표시자로서 osteocalcin, procollagen I carboxyl terminal extension peptide 및 염기성 인산 분해 효소 활성도 등이 이용되는데⁵⁵⁾ 본 연구에서는 주로 세포막에 결합되어 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내고⁵⁶⁾, 유기인산 에스테르를 가수분해하여 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 세포기질에 calcium phosphate 침착을 유도하며⁵⁷⁻⁵⁹⁾, 세포분열이나 분화의 조절자⁶⁰⁾로서의 역할을 하는 염기성 인산 분해 효소를 대상으로 측정하였다. 본 연구에서는 혈청군과 혈소판 농축 혈장군이 대조군에 비해 증가된 염기성 인산 분해 효소 활성을 보였는데 이는 태생기 쥐의 골에서 PDGF-AB, BB적용시 염기성 인산 분해 효소 활성이 감소한다는 Centrella 등⁶¹⁾과 PDGF-BB가 조골세포의 증식은 촉진시키는 반면 개개 세포의 기능은 억제한다는 최 등⁶²⁾의 보고와 상반된 결과를 보인다. 이는 Centrella와 최 등은 PDGF만을 이용하는데 반해 본 연구에서는 PDGF외에도 PDGF를 조절하거나 PDGF와 상호 작용하는 TGF- β , IGF, EGF, FGF 등이 포함되어 있어서 조골세포의 활성을 증가시킨 것으로 사료되었다.

본 연구의 결과 calcium phosphate가 피막된 배양 접시에서 혈청을 부착시킨 군과 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군이 대조군에 비해 조골세포의 증식도나 세포 활성에서는 증가를 보였지만 혈청을 부착시킨 군과 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군간에는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 한편, 조골세포의 세포 부착도 측정에서는 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군이 혈청을 부착시킨 군이나 대조군보다 통계적 처리는 할 수 없었지만 현저한 세포 부착의 증가를 관찰할 수 있었다. 이로 미루어보아 혈소판 농축 혈장이 조골세포의 증식과 활성보다는 초기의 세포 부착에 더 많은 영향을 주는 것으로 판단되었다. 그러나 혈소판 농축 혈장 내의 다른 성장인자들이 조골세포에 미치는 영향이나 성장인자간의 농도에 따른 상호 조절기전에 관한 연구가 추가적으로 시행되어야 할 것으로 사료되었다.

V. 결론

혈소판 농축 혈장이 세포수준에서 조골세포의 초기 부착과 조골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 백서의 혈액을 채취하여 혈소판 농축 혈장을 만들고 calcium phosphate가 피막된 배양 접시 그대로 둔 것을 대조군으로 하고 혈장을 부착시킨 군, 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군으로 나누어 후, 각각의 PDGF-BB, TGF- β 의 부착량을 측정하고, 다시 HOS 세포와 ROS 17/2.8 세포를 부착시킨 후 세포의 부착도를 평가하고, 세포 증식도, 염기성 인산분해 효소 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈액성분 중 분리된 혈청과 혈소판 농축 혈장부분의 혈소판을 계수한 결과 혈청 내 혈소판수에 비해 혈소판 농축 혈장내의 혈소판이 약 9배 높게 나타났다.
2. PDGF-BB는 calcium phosphate가 피막된 배양 접시에 혈청 및 혈소판 농축 혈장의 양에 비례하여 높게 부착하였으나 TGF- β 는 50 μ l의 혈소판 농축 혈장을 처리한 경우에만 높게 부착되었다(p<0.01).
3. 혈청과 혈소판 농축 혈장을 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, 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 경우 1시간 및 4시간 경과 후 대조군에 비해 현저히 세포의 부착이 증가되었다.
4. 혈청과 혈소판 농축 혈장을 3시간 부착시킨 후 HOS와 ROS17/2.8 세포를 48시간 배양한 경우, 세포증식이 현저히 증가되었으나 혈청과 혈소판 농축 혈장군 간의 차이는 보이지 않았다(p<0.05).
5. 혈청과 혈소판 농축 혈장을 3시간 부착시킨 후 HOS와 ROS17/2.8 세포를 48시간 배양한 경우, 염기성 인산 분해효소의 활성이 현저히 증가되었다(p<0.01).

이상의 결과로 보아 calcium phosphate 피막된 배양접시에서 대조군이나 혈청을 부착시킨 군과 비교하였을 때 혈소판 농축 혈장을 부착시킨 군이 조골세포의 증식과 활성보다는 초기의 세포 부착에 더 많은 영향을 주는 것으로 사료되었다.

VI. 참고문헌

- Mish CE, Dietsch F.: Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993; 2: 158-167.
- Ellegaard B, Karring T and Loe H.: Retardation of epithelial migration in new attachment attempts in infrabony defects in monkeys. *J Clin Periodontol* 1976; 3: 23-37.
- Hislop WS, Finlay PM and Moos KP.: A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1993; 31: 149-153.
- Lane JM.: Bone graft substitutes. *Western J Med* 1995; Dec: 565-567.
- Rummelhart JM, Mellonig JT, Gray JL and Towle HJ.: A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1989; 60: 655-663.
- Garraway R, Young WG, Daley T, Harbrow D and Bartold PM.: An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. *J Periodontol* 1998; 69: 1325-1336.
- Chow LC, Markovic M and Tagaki S.: Calcium phosphate cements. In: Struble LJ, editor. *Cements research progress*. Westerville, OH.: The American Ceramic Society. 1998. p. 215-237.
- Higashi S, Ohsumi T, Ozumi K, Kuroki K, Inokuchi Y and Terashita M.: Evaluation of cytotoxicity of calcium phosphate cement consisting of β -tricalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate. *Dent Mater J* 1998; 17: 186-194.
- Yoshimine Y, Sumi M, Isobe R, Anan H and Maeda K.: In vitro interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells. *Biomaterials* 1996; 17: 2241-2245.
- Bowen-Pope DF, Vogel A and Ross R.: Production of platelet-derived growth factor-like molecules, reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agents: *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2396-2420.
- Greenlough DG.: The role of growth factors in wound healing: *J Trauma* 1996; 41: 159-167.
- Howell TH, Fiorellini JP and Paquette DW.: A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997; 68: 1186-1193.
- Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB and Arceo-Diaz LL.: Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52: 161-166.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstedt RM, Schimmele SR, Strauss JE and Georgeff KR.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 638-646.
- 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.
- Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J

- and Kammeyer G.: Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I - Background and processing techniques. *J Oral Implantol*. 2001; 27: 38-42.
17. Kassolis JD, Rosen PS and Reynolds MA.: Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000 Oct; 71: 1654-1661.
 18. Vercellotti T.: Piezoelectric surgery in implantology: a case report - a new piezoelectric ridge expansion technique. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000 Aug; 20: 358-365.
 19. Jiang D, DZiak R, Lynch SE and Stephan EB.: Modification of Bio-Oss with growth factors: Effects on osteoblastic cell proliferation. *J Periodontol* 1998; 85: 638-646.
 20. Antonaides HN.: Human platelet derived growth factor: Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced sub-units: *Proc Natl Acad Sci USA*: 1981; 78: 7314-7317.
 21. Celeste AJ, Iannazzi JA and Taylor RC.: Identification of transforming growth factor beta to family members present in bone-inductive protein purified bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9843-9847.
 22. Roberts AB, Spron MB.: Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta. *Growth Factors* 1993; 8: 1-9.
 23. Miyazono K, Ten-Dijke P, Ichiyo H and Heldin CH.: Receptors for transforming growth factor-beta. *Adv Immunol* 1994; 55: 181-220.
 24. Pierce GF, Tarpley J and Yanagihara D.: PDGF-BB, TGF- β 1 and basic FGF in dermal wound healing: Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992; 140: 1375-1388.
 25. Mohan S, Baylink DJ.: Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 263: 30-43.
 26. Rutherford RB, Trilsmith MD, Ryan HE and Charette MF.: Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factors mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 139-145.
 27. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI and Genco RJ.: Mitogenic chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992; 63: 515-525.
 28. Oates TW, Rouse CA and Cochra DI.: Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993; 64: 142-148.
 29. Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R and Forstrom JW.: Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 1990; 29:166-172.
 30. Piche JE, Graves DT.: Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: A comparison with human fibroblasts. *Bone* 1989; 10: 131-138.
 31. Lynch SE, Colvin RV and Antonaides HN.: Growth factors in wound healing: Single and synergistic effects on the partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 1989; 84: 640-646.
 32. Seifert RA, Hart CE, Phillips PE., Forstrom JW, Ross R, Murray MJ and Bowen-Pope DF.: Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* 1989; 264, 8770-8778.
 33. Kells AF, Schwartz HS, Bascom CC and Hoover RL.: Identification and analysis of transforming growth factor beta receptors on primary osteoblast-enriched cultures derived from adult human bone. *Connet Tissue Res* 1992; 27: 197-209.
 34. Hughes FJ, Aubin JE and Heersche JN.:

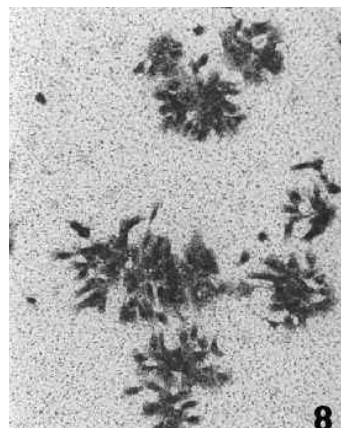
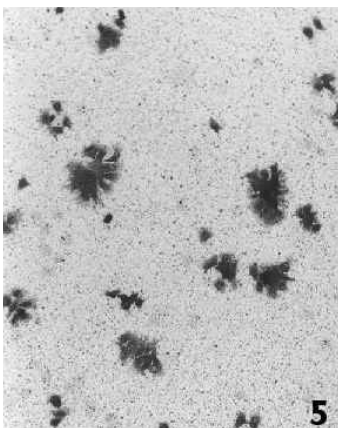
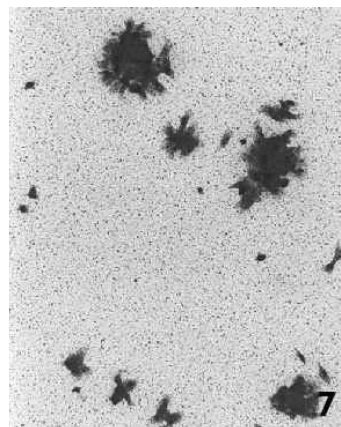
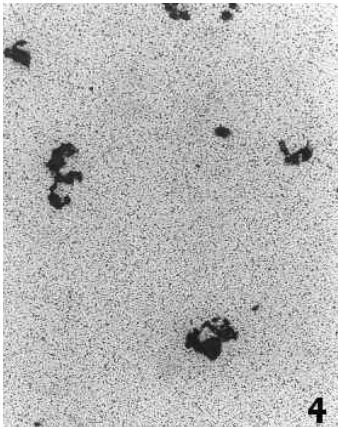
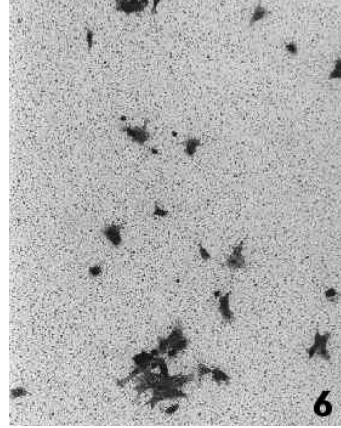
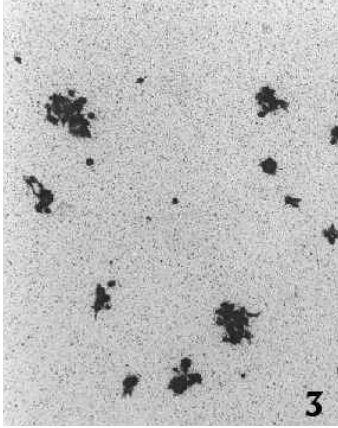
- Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner* 1992; 19: 63-74.
35. Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Grownwald RG, Minne HW and Ziegler R.: Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors. *Endocrinology* 1990; 127: 69-75.
 36. Salomon GD, Kasid A, Bernstein E, Buresh C, Director E and Norton JA.: Gene expression in normal and doxorubicin-impaired wounds: Importance of transforming growth factor-beta. *Surgery* 1990; 108: 318-322
 37. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB and Roberts AB.: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol* 1987; 105: 457-463.
 38. Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB and Sporn MB.: Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987; 105: 2861-2876.
 39. Noda M, Camilliere JJ.: In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 1989; 124: 2991-2994.
 40. Roberts AB, Sporn MB.: The transforming growth factor-beta. In: Sporn MB, Roberts AB.: Peptide growth factors and their receptors. Berlin: Springer-Verlag 1990; 419-472.
 41. Loeffler EB, Proper JA, Goustein AS, Shipley GD, DiCorleto PE and Moses HL.: Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor- β . A proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2453-2457.
 42. Bategay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF and Ross R.: TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine loop. *Cell* 1990; 63: 515-524.
 43. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B and Caffesse RG.: Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1994; 65: 641-648.
 44. Le Geroz RG, Orly I, Gregoire M and Daculsi G.: Substrate surface dissolution and interfacial biological mineralization. In: Davies JE, editor. The bone-biomaterial interface. Toronto: Univ Toronto Press. 1991. p76-88.
 45. Radin S, Ducheyne P.: The effect of calcium phosphate composition and structure on in vitro behavior II. Precipitation. *J Biomed Mat Res* 1993; 27: 35-44.
 46. Radin S, Ducheyne P.: Kinetics of the in vitro surface transformation of bioactive ceramics to biologically equivalent apatite. In: Ducheyne P, Christiansen D, editor. *Bioceramics 6*. Oxford: Butterworth-Heinemann 1993. p59-65.
 47. Kokubo T, Ito S, Huang T, Hayashi T, Sakka S, Kitugi S and Yamumara T.: Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mat Res* 1990; 25: 331-343.
 48. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitugi S and Yamumaro T.: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mat Res* 1990; 24: 721-734.
 49. Kokubo T.: Analysis of ceramic-tissue interface reaction. In: Ducheyne P, Christiansen D, editors. *Bioceramics 6*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1993. p73-78.
 50. El-Ghannam A, Ducheyne P and Shapiro IM.: Formation of surface reaction products on bioac-

- tive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials* 1997; 18(4): 295-303.
51. Lynch SE, Genco RJ and Marx RE.: Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Quintessence publishing Co, Inc 1999. p78-79
 52. Canalis E.: Effect of PDGF on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 1981; 30: 970-975.
 53. 정성민, 이만섭, 권영혁, 조종만: 혈소판 유래 성장인자가 치주인대의 증식에 미치는 효과에 관한 연구. *대한치주과학회지* 1992; 22: 317-330.
 54. Blom S, Holmstrup P and Dabelsteen E.: A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast like cells DNA synthesis and morphology. *J Periodontol* 1994; 65: 373-378.
 55. Aufmkolk B, Huashcka PV and Schwartz ER.: Characterization of human bone cell in culture. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 228-235.
 56. Fernley HN.: Mammalian alkaline phosphatases, in *The Enzymes*, vol,4, edited by Boyer PD., Academic Press, New York, 1971. p417-447.
 57. Anderson HC.: Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989; 60: 320-330.
 58. Beertsen W, Theo Van Den Bos.: Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. *Matrix* 1989; 9: 159-171.
 59. Bellows CG, Aubin JE and Heersche JNM.: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 1991; 14: 27-40.
 60. Farley JR, Puzas JE and Baylink DJ.: Effect of skeletal alkaline phosphatase inhibitors on bone cell proliferation in vitro. *Mineral Electrolyte Metab* 1982; 7: 316-323.
 61. Centrella M, McCarthy TL and Canalis E.: Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinology* 1989; 125: 13-19.
 62. 최형호, 김정근, 임성빈, 정진형: Platelet-derived growth factor가 조골세포의 활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1999; 29: 785-801.

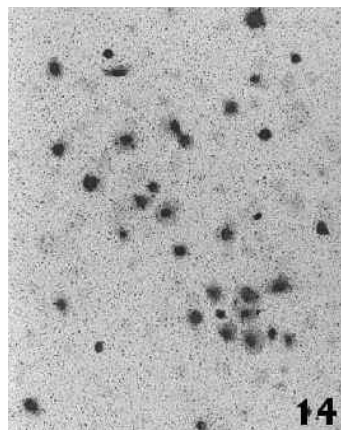
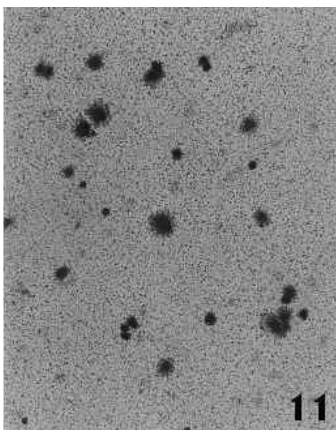
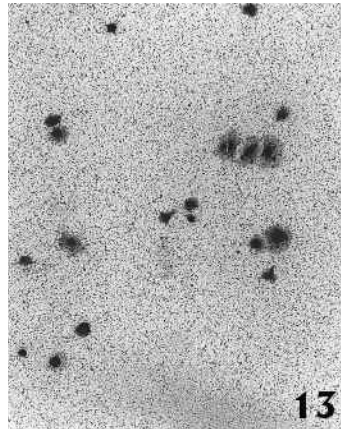
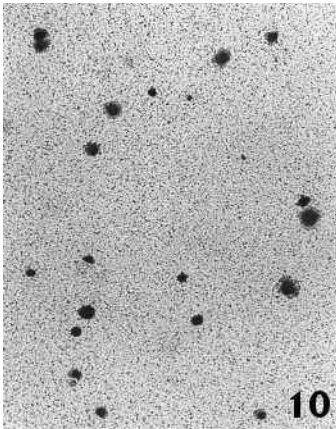
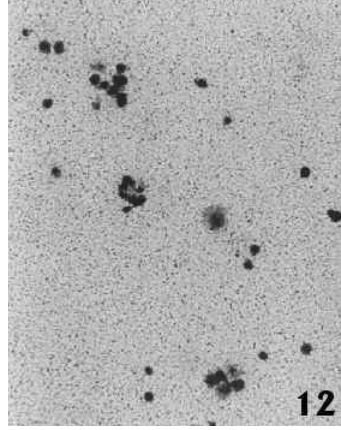
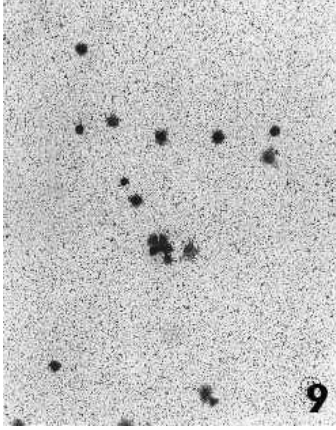
사진부도 설명

- Figure 3 Control group, attached HOS cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 4 Serum group, attached HOS cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 5 PRP group, attached HOS cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 6 Control group, attached HOS cell for 4 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 7 Serum group, attached HOS cell for 4 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 8 PRP group, attached HOS cell for 4 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 9 Control group, attached ROS 17/2,8 cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 10 Serum group, attached ROS 17/2,8 cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 11 PRP group, attached ROS 17/2,8 cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 12 Control group, attached ROS 17/2,8 cell for 4 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 13 Serum group, attached ROS 17/2,8 cell for 1 hour (Toluidine blue, ×100)
- Figure 14 PRP group, attached ROS 17/2,8 cell for 4 hour (Toluidine blue, ×100)

사진부도 (I)



사진부도 (II)



Biological Effect of Platelet Rich Plasma on the Initial Attachment, Proliferation and Cellular Activity of Osteoblast

Sang-Il Park¹, Chin-Hyung Chung¹, Sung-Bin Lim¹, Jung-Keun Kim²

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Dan-Kook University

²Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Dan-Kook University

For reconstruction of the bony defect, various artificial substitutes were developed. Among them, there has been a study of calcium phosphate coated bone substitutes for increasing attachment of osteoblasts in vivo. The purpose of this study was to evaluate the effects of serum and platelet-rich plasma (PRP) on calcium phosphate coated culture plate for the initial attachment, proliferation and activity of osteoblasts. After sampling the blood from white rats and concentrating by centrifugation, the amount of attachment of PDGF-BB and TGF- β on the calcium phosphate coated culture plate was measured. Cultured HOS and ROS 17/2,8 cell was measured on attachment level and proliferation rate of osteoblasts. Alkaline phosphatase activity of HOS and ROS 17/2,8 cell was measured for studying on the activating rate of osteoblast.

1. Counting the amount of platelets of separated plasma and PRP, the average number of platelets was 177,003 cell/ μ l in plasma, and 1,656,062 cell/ μ l in PRP, which was about 9 times as high as in plasma.
2. Amount of PDGF-BB deposited at calcium phosphate coated plate had increased by the total amount of plasma and PRP on the culture plate, whereas TGF- β had been deposited on the plate only when treated by 50 μ l of PRP ($p < 0.01$).
3. After plating serum and PRP for 3 hours, we attached with HOS and ROS17/2,8 cell for 1 hour and 4 hours. There were no significant difference of the attachment between serum and control group, whereas there were significantly difference of the attachment between deposition of PRP and control group.
4. After attaching plasma and PRP for 3 hours, cell number has much increased when HOS and ROS17/2,8 cell had been cultured for 48 hours ($p < 0.05$).
5. After attaching plasma and PRP for 3 hours, concentration of alkaline-phosphatase has increased when HOS and ROS17/2,8 cell had been cultured for 48 hours ($p < 0.01$).

These results suggested that PRP affected on initial cell attachment rather than proliferation and activation of osteoblasts at calcium phosphate coated plate.