

혈소판농축혈장 내의 성장요소가 조골세포주의 활성화에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 보철학교실

정태욱 · 김영수 · 김창희 · 장경수 · 임영준

I. 서 론

완전 무치악 환자의 수복을 위해 개발되었던 치과용 임플란트는 많은 연구를 통해 적용영역을 넓히고 성공률을 높혀 왔다. 초창기의 주된 관심사는 환자의 현재의 골상태에서 임플란트의 성공적인 골융합을 얻어내어 수복을 하는 것이었기 때문에 임플란트와 보철물을 수용하기에 충분한 골의 양과 좋은 골질이 가장 중요한 요구조건이었다.¹⁾ 하지만 이런 요구조건들은 임플란트의 적응증을 아주 이상적인 조건을 가진 환자들에게만 적용되게 하였고 다양한 상황에 처해 있는 환자들의 요구를 충족시키지 못했다.

그러나 임플란트 치료의 예후에 관한 장기간의 긍정적인 연구결과들이 발표되면서 임플란트의 적응증은 넓어지게 되었다. 골양이 부족한 경우에는 골유도재생술(guided bone regeneration), 골이식술(bone graft), 상악동거상술(sinus lift) 등과 같은 수술을 통해 부족한 골을 보충할 수 있었으며 골질이 나쁜 경우에도 임플란트의 형태, 표면처리 등을 골 형성 반응에 유리하게끔 변화시켜 우수한 골융합을 유도할 수 있게 되었다. 최근에는 골반응을 촉진하여 총 치료기간을 줄이고자 하는 시도들이 많이 행해지고 있다. 임플란트의 재료, 기하학적인 형태, 표면처리 방식들을 변화시켜 보다 빠른 골과의 반응을 얻고자 하는 것들과 골-임플란트 계면에서 일어나는 창상치유과정(wound healing process)에 관여하는 여러 생물학적 요소들이 보다 효과적으로 기능

할 수 있도록 주변의 환경을 바꾸어 주는 것들이 있다. 골형성에 보다 유리한 주변 환경을 만들고자 제안된 방법들로 성장호르몬을 투여하는 방법,²⁾ 섬유소접착시스템(fibrin adhesive system)³⁾을 이용하는 방법, 지속적인 전기자극을 가해 주는 방법⁴⁾ 등이 시도되었지만 한정된 성과만을 얻을 수 있었다.

골형성을 촉진하고자 하는 또 다른 방법으로 골성장요소(bone growth factor)를 이용하는 것이다. 성장요소는 세포의 증식과 분화에 중요한 국소적 조절인자(local regulator)로서 작용한다고 알려져 있다.^{5,6)} 대식세포(macrophage)를 포함한 다양한 세포들에게서 이런 성장요소들이 합성, 분비되는데 특히 혈소판에는 PDGF(platelet derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor - beta), IGF-1(insulin like growth factor-1), ECGF(epidermal cell growth factor) 등의 다양한 성장요소가 있다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 혈소판내 성장요소들의 효과를 이끌어내기 위한 방법으로 수술 전에 환자의 혈액을 채취, 혈액내의 혈소판을 원심분리법을 통해 고농도로 농축시킨 혈장을 만든 다음 수술부위에 그 혈장을 골 대체제들과 혼합하여 적용하는 방법이 있다. 이를 혈소판농축혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 이용한 방법이라 한다.^{8,9)} 하악골재건술,¹⁰⁾ 발치창의 치유,¹¹⁾ 상악동 거상술,¹²⁾ 치주질환의 치치¹³⁾ 등에서 혈소판농축혈장을 자가골이나 골 대체제 등과 섞어 적용하였을 때 사용하지 않은 군보다 높은 골 형성 및 성숙도를 보였다는 많은 임상보고들은 혈소판농

축혈장이 창상치유과정에 관련된 일련의 세포들의 능력을 향상시킨다는 사실, 특히 조골세포의 골 형성 능력을 향상시킨다는 사실을 입증해 준다. 하지만 대부분의 보고들은 임상실험결과를 통한 혈소판 농축혈장의 골형성 항진효과에 대해 언급하고 있지만 실제로 혈소판농축혈장내의 요소들이 골형성 능력 향상에 효과적으로 작용하는 기전에 대한 연구는 아직 없는 실정이다.

이에 본 연구의 목표는 혈소판농축혈장내의 성장 요소들이 조골세포주의 활성화에 미치는 영향을 조사하는 것이었다. 골기질에서 많이 발견되는 성장요소인 PDGF, TGF- β , IGF-1, bFGF의 재조합성장요소(recombinant growth factor)와 성장요소들의 중화항체(neutralizing antibody)를 이용하여 혈소판농축혈장이 조골세포의 부착과 증식에 끼치는 영향을 비교하였다. 조골세포의 성장요소에 대한 오토크린(autocrine), 파라크린(paracrine) 효과를 평가하기 위해서 혈소판농축혈장의 조건배지(conditioned medium, CM)를 만들어서 혈소판농축혈장과 비교 평가하였고 실제로 성장요소들이 혈소판농축혈장과 조건배지에서 발현되는 지를 Western blot 분석을 통해서 관찰하고자 하였다. 아울러 혈소판농축혈장, 조건배지 및 성장요소들에 의한 세포의 변화를 광학현미경을 통해 관찰하였다.

II. 실험재료 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 75cm², SARSTEDT, Newton, USA)에서 키웠다. 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, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 배양액에 첨가하였으며 5% CO₂하에서 34°C, 100%습도의 조건이 유지되는 세포배양기(Multi Gas CO₂ incubator, ASTEC, Fukuoka, Japan)에서 배양하였다(Fig. 2).

2. 혈소판농축혈장의 제조

혈소판농축혈장 제조를 위하여 56mL의 항응고제인 citrate phosphate dextrose adenine (CPDA)가 든 채혈주머니(blood collection bag)에 (Fig. 3) 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) 2500rpm(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°C 초저온냉동기(deep freezer)에 보관하였다가 실험에 사용하였다(Fig. 5). 실험자의 전혈내의 혈소판 수는 239,000개/uL로 정상범주에 속했으며 혈소판농축혈장에서는 1,107,000 개/uL로 약 463% 혈소판 농축이 이루어졌다.

3. 혈소판농축혈장의 조건배지의 제조

조골세포주를 100mm²의 세포배양접시(cell culture dish: Falcon, Becton Dickinson, USA)에 80~90%로 증만해질 때까지 배양한 후 어린송아지 혈청이 포함되지 않은 5ml DMEM 배지로 교체하여 48시간 동안 세포배양기 하에 정치하였다가 100ul/mL의 혈소판농축혈장을 배양액에 추가하여 약 2시간 정도 혈소판농축혈장에 세포를 노출시킨 후, 다시 어린송아지 혈청이 포함되어있지 않은 5ml

의 DMEM 배지로 교체하여 24시간 동안 배양기에 둔 뒤 배양액을 모았다(Fig. 6).

4. 세포부착분석(cell attachment assay)

모든 실험에 사용되는 세포는 10% 어린 송아지 혈청이 포함된 DMEM/F12 배지에서 키웠다. 세포 부착분석을 위해 10% 어린 송아지 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지가 담긴 96 well culture plate (Falcon, Becton Dickinson, USA)에 조골세포주를 2×10^5 cell/mL의 농도로 0.1mL 씩 분주를 하였다. 분주 후 실험군과 대조군으로 분리하여 실험군에는 혈소판농축혈장을 5ul/mL의 농도로, 성장요소의 효과를 알아보기 위해서 5ng/mL의 농도로 사람의 재조합성장요소인 TGF- β (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), PDGF(Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), IGF-1(Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), bFGF (R&D systmes, Inc., Minneapolis, MN, USA) 를 각각 첨가하였다. 또, 혈소판농축혈장에 의해 조골세포주로부터 유리되는 단백질의 효과를 보기 위하여 조건배지를 5ul/mL 농도로 첨가하여 정치해 두었다. 대조군에는 혈소판농축혈장을 처리하지 않고 어린 송아지 혈청이 포함되지 않은 혈청 없는 배지(serum free media)를 첨가하였다. 34°C, 5% CO₂, 100% 습도의 조건이 유지되는 세포배양기에서 2시간동안 세포를 정치한 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°C에서 10분간 배양한 후 MTT assay를 시행하여 분광측정기(spectrophotometer, GeneSecIII, Hitachi, Japan)를 이용, 540nm의 흡광도를 측정하였다.

5. 세포증식분석(cell proliferation assay)

조골세포주를 2×10^4 cells/mL의 농도로 96 well culture plate에 분주한 후 10% 어린 송아지 혈청이 포함된 DMEM/F12 배지를 이용하여 세포를 34°C, 5% CO₂, 100% 습도의 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 세포 분주 후 6시간이 지나 세포가 배양접시에 안착이 되면 어린 송아지 혈청이 포

함되지 않은 DMEM으로 교체하여 12시간 동안 배양기에서 배양하였다. 이 후, 실험군에는 5ul/mL 농도의 혈소판농축혈장과 조건배지, 5ng/mL의 농도로 PDGF, TGF- β , IGF-1, bFGF를 각각 첨가하였으며 세포 배양 후 1일, 2일, 3일, 4일이 지난 후 각각 MTT assay를 시행 하였다. MTT 분석시약으로 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent (Promega, Madison WI, USA)을 사용하였다. 실험 배지에 MTT 분석시약을 각각 20uL를 첨가하고 34°C, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되는 배양기에서 2시간동안 배양한 후 490nm에서의 흡광도를 분광측정기를 이용하여 측정하였다.

6. Immunoblotting 법을 이용한 성장요소생성의 측정(Western blot analysis)

100mm² 세포 배양 접시에 조골세포주를 2×10^4 cell/mL의 농도로 분주, 세포가 80~90%로 증만해지면 어린 송아지 혈청이 없는 DMEM 배지로 교환해 주고 24시간이 지난 후 실험군에는 혈소판농축혈장과 조건배지를 각각 10ul/mL씩 첨가해 주었다. 24 시간후 배양액을 모아서 Bradford법을 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°C에서 blocking 한 후 15분씩 2회 TBST로 세척하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 IGF-1, bFGF인 경우는 Sigma-aldrich (Sigma, St.Louis, MO, USA), PDGF는 BD bioscience (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)로부터 구입, 각각 1:2500, 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 12시간 동안 반응시켰다. 2차항체는 anti mouse Ig-G antibody(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1:5000으로 희석하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 각각 5분씩 TBST로 3회 세척한 후 chemiluminescent substrate (ECL kit, Amersham, USA)를 사용하여 HRP의 활성을 분석하였다.

7. 성장요소 중화항체를 이용한 세포부착 및 증식 변화분석

혈소판농축혈장 및 조건배지에서 성장요소가 미치는 영향을 알아보고자 실험에 사용된 재조합 성장요소의 중화항체를 이용하여 변화양상을 관찰하였다. 세포부착과 증식의 변화를 관찰하기 위해 크게 혈소판농축혈장군과 조건배지군으로 나누었다. 실험군으로 중화항체를 넣지 않은 군, TGF- β , PDGF, IGF-1, bFGF의 중화항체를 각각 1/100로 희석하여 10ug/mL의 농도로 넣은 군으로 설정하고 대조군으로 혈청 없는 배지를 설정하였다. 각각 설정된 실험군과 대조군은 앞서 언급한 세포부착분석과 증식분석과 같은 방식으로 진행되었다.

8. 세포형태관찰

세포형태변화를 관찰하기 위해서 증식 3일째의 세포들의 슬라이드를 제작하여 광학현미경($\times 200$)을 통해서 관찰하였다.

Table I. The effect of PRP, PRP-CM, growth factors on the cell attachment(n=5)

	O.D. (540nm)	S.D. (E-02)	% control
control	0.0694	0.47	100.00
PRP	0.0897*	0.47	129.28
PRP-CM	0.0865*	0.21	124.75
TGF- β	0.0773*	0.41	111.42
bFGF	0.0741*	0.49	106.82
PDGF	0.0719	0.43	103.64
IGF-1	0.0794*	0.46	114.50

(n: number of experiments. O.D.: mean absorbance at 540nm, control: serum free DMEM, PRP: 5ul/mL, PRP-CM: 5ul/mL, TGF- β : 5ng/mL, bFGF: 5ng/mL, PDGF: 5ng/mL, IGF-1: 5ng/mL, *: p<0.05, t-test, significant difference compared to control group)

9. 통계분석

각각의 실험은 3~5번씩 반복되었으며 각 실험에서 얻어진 흡광도의 값은 평균값을 표시하였다. 각 군 간의 비교를 위해서 Student's t-test를 사용하였다. P값이 0.05 이하인 경우에는 유의성 있는 차이가 있는 것으로 분석하였다.

III. 연구결과

1. 세포부착의 변화

Table I은 각 실험군의 세포부착과 관련된 평균 흡광도의 값을 보여주고 있다. 혈소판농축혈장과 조건배지, 재조합성장요소인 TGF- β , bFGF, IGF-1군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 세포부착이 증가되었다. 특히 혈소판농축혈장군과 조건배지군에서 가장 높은 세포부착의 증가가 나타났으며 두 군 간의 통계학적인 차이도 없었다. 재조합 성장요소들 중에서는 IGF-1에서 가장 높은 부착증가가 관찰되었다.

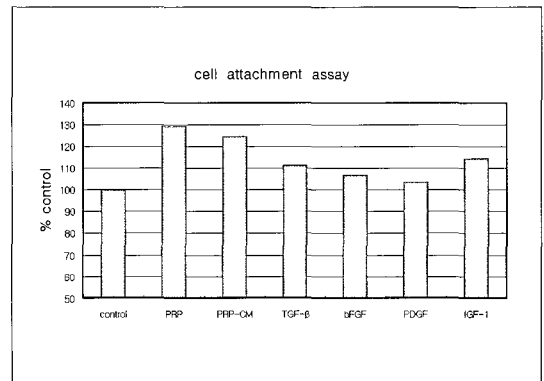


Fig. 6. The effect of PRP, PRP-CM, growth factors on the cell attachment.

2. 세포증식의 변화

Fig. 7은 혈소판농축혈장과 조건배지, 재조합 성장요소들을 첨가하고 난 후의 흡광도 변화를 보여주고 있다. 모든 실험군에서 시간에 따라 값이 증가, 3일째 최대 값을 보이다 4일째 감소되는 양상을 보였다. 세포부착의 변화와 마찬가지로 세포증식에서도 혈소판농축혈장과 조건배지군에서 가장 높은 값의 증가가 관찰되었고 증가된 양도 비슷하였다. 재조합성장요소들 모두 다 세포증식을 증가시켰지만 IGF-1을 첨가했을 때가 가장 높은 값을 가졌다.

Table II는 각 실험군끼리의 통계 분석을 위해 세포증식이 최고로 많이 증가한 3일째의 흡광도값을 비교한 것이다. 모든 군에서 통계적으로 유의성 있는 세포증식의 증가가 관찰되었다.

3. 성장요소확인을 위한 Western blot분석

혈소판농축혈장과 조건배지에서 성장요소 존재 확인을 위한 Western blot결과를 Fig. 8은 보여준다. 대조군에 반해 두 실험군에서 bFGF의 분자량인 16kd, PDGF의 분자량인 27-30kd, IGF-1의 분자량인 7.5kd부근에 해당하는 곳에서 명확한 띠가 관찰되었다.

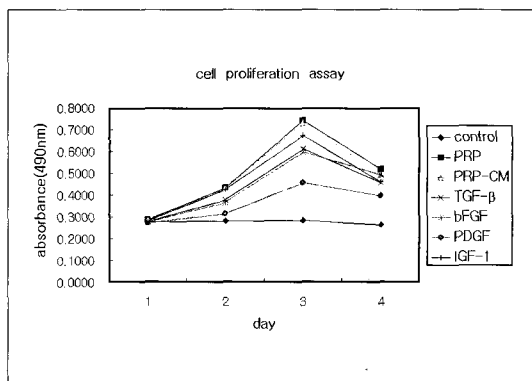


Fig. 7. The effect of PRP, PRP-CM, growth factors on the cell proliferation(O.D.).

4. 성장요소의 중화항체에 의한 세포부착 변화

성장요소의 중화항체를 사용했을 때의 변화된 흡광도를 Table III은 보여준다. 혈소판농축혈장군에서는 중화항체를 투여하지 않은 실험군에 대해 중화항체를 투여한 실험군 모두에서 통계적으로 유의성 있는 부착감소를 가져왔다. 조건배지군에서는 전체적인 감소는 보였지만 TGF-β, IGF-1의 중화항체군에서만 유의성 있는 부착감소가 나타났다. ab-IGF-1군 ($P=0.094$) >0.05 , PRP)과 ab-TGF-β군 ($p=0.096$) >0.05 , CM)에서는 부착감소량이 커서 대조군에 대해 유의성 있는 차이가 없을 정도까지 감소하였으며 감소량은 ab-IGF-1군에서 제일 컸다.

5. 성장요소 중화항체에 의한 세포증식 변화

Fig. 9와 10은 성장요소의 중화항체를 투여했을 경우의 흡광도 변화값을 나타낸 도표이다. 혈소판농축혈장군이나 조건배지군 모두에서 중화항체를 투여하였을 때 전체적인 세포증식량은 대조군에 비해서 증가되었지만 항체를 넣지 않은 군에 비해서는 세포증식량에 있어 현저한 감소가 나타났다.

Table IV은 각 실험군간의 통계 분석을 위해 세포증식 변화의 차이가 가장 큰 3일째의 흡광도값을 비

Table II. Cell proliferation on 3rd day(n=5)

	O.D. (490nm)	S.D.	% control
control	0.2846	2.33E-02	100.00
PRP	0.7424*	9.44E-03	260.85
PRP-CM	0.7301*	7.78E-02	256.53
TGF-β	0.6123*	7.03E-02	215.14
bFGF	0.5961*	9.49E-02	209.41
PDGF	0.4568*	7.00E-02	160.50
IGF-1	0.6721*	7.96E-02	236.12

(n: number of experiments, O.D.: mean absorbance at 490nm, control: serum free DMEM, PRP: 5ul/mL, PRP-CM: 5ul/mL, TGF-β: 5ng/mL, bFGF: 5ng/mL, PDGF: 5ng/mL, IGF-1: 5ng/mL, *: $p<0.01$, t-test, significant difference compared to control group)

Table III. The effect of neutralizing antibody on the cell attachment(n=3)

	PRP			PRP-CM		
	O.D.(540nm)	S.D.	% control	O.D.(540nm)	S.D.	% control
no ab	0.2661 #	1.33E-02	208.37	0.2492 #	1.51E-02	195.18
ab-TGF- β	0.1781* #	5.70E-03	139.49	0.1619*	4.30E-03	126.83
ab-bFGF	0.2019* #	1.87E-02	158.13	0.2001 #	2.22E-02	157.06
ab-PDGF	0.2264* #	4.00E-03	177.32	0.1924 #	1.33E-03	150.71
ab-IGF-1	0.1489*	1.38E-02	116.63	0.1612* #	8.89E-03	126.26
control	0.1277*	1.23E-02	100.00	0.1277*	1.23E-02	100.00

(n: number of experiments, O.D.: mean absorbance at 540nm, control: serum free DMEM, PRP: 5ul/mL, PRP-CM: 5ul/mL, ab-TGF- β : 10ug/mL, ab-bFGF: 10ug/mL, ab-PDGF: 10ug/mL, ab-IGF-1: 10ug/mL, *: p<0.05, t-test, significant difference compared to no ab group, #: p<0.05, significant difference compared to control group)

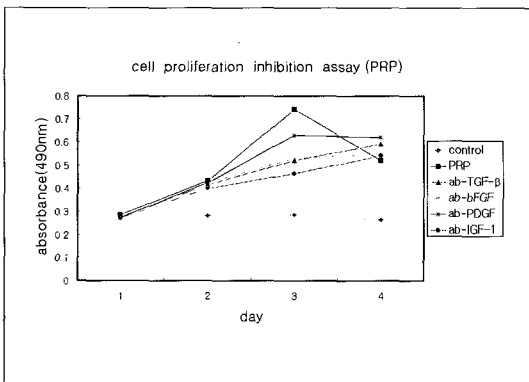


Fig. 9. The effect of neutralizing antibody on the cell proliferation(PRP, O.D.).

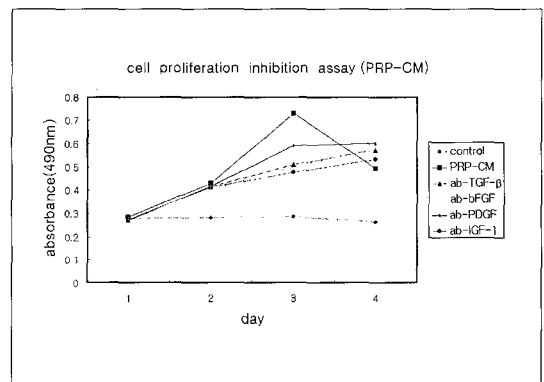


Fig. 10. The effect of neutralizing antibody on the cell proliferation(PRP-CM, O.D.).

교한 것이다. 성장요소 중화항체를 넣은 모든 실험군에서 항체를 넣지 않은 군에 대해 통계적으로 유의할만한 세포증식량의 감소가 관찰되었다. 하지만 대조군에 대해서는 여전히 모든 군에서 유의할 만한 세포증식은 관찰되었다.

6. 광학현미경을 이용한 세포형태관찰

배양후 3일째의 세포들을 대상으로 각 실험군의 형태를 관찰하였다. 대조군은 혈청 없는 배지에서 키운 세포인데 원래 분주하기전의 세포의 형태와 비

슷하게 길고 가늘면서 세포돌기의 발달이 낮았다. 혈소판농축혈장군과 조건배지군에서는 이와는 다르게 세포들이 굵어지면서 많은 세포돌기가 형성, 서로 연결된 형태를 관찰할 수 있었다. 재조합성장요소인 경우에도 대조군에 비해 세포들이 굵고 많은 세포돌기를 가지고 있는 것을 관찰할 수 있었지만 혈소판농축혈장군에서 나타나는 발달정도는 아니었다. 성장요소들중에서는 TGF- β , IGF-1군에서 세포가 더 둥글면서 굵어져 있었고 세포돌기가 발달되어 있었다(Fig. 11).

Table IV. The effect of neutralizing antibody on the cell proliferation(3rd day, n=3)

	PRP			PRP-CM		
	O.D.(490nm)	S.D.	% control	O.D.(490nm)	S.D.	% control
no-ab	0.742 [#]	9.44E-03	260.85	0.730 [#]	7.78E-02	256.53
ab-TGF- β	0.521 ^{* #}	8.35E-02	182.92	0.509 ^{* #}	7.36E-02	178.70
ab-bFGF	0.531 ^{* #}	7.94E-02	186.47	0.499 ^{* #}	1.17E-01	175.36
ab-PDGF	0.630 ^{* #}	7.78E-02	221.25	0.590 ^{* #}	7.30E-02	207.37
ab-IGF-1	0.464 ^{* #}	4.88E-02	162.86	0.476 ^{* #}	8.95E-02	167.18
control	0.285 [*]	2.33E-02	100.00	0.285 [*]	2.33E-02	100.00

(n: number of experiments, O.D.: mean absorbance at 490nm, control: serum free DMEM, PRP: 5ul/mL, PRP-CM: 5ul/mL, ab-TGF- β : 10ug/mL, ab-bFGF: 10ug/mL, ab-PDGF: 10ug/mL, ab-IGF-1: 10ug/mL, *: p<0.05, t-test, significant difference compared to no ab group, #: p<0.05, significant difference compared to control group)

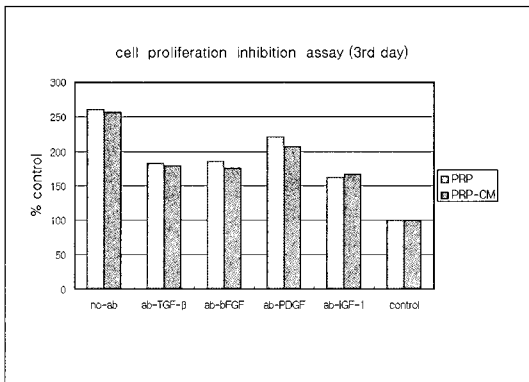


Fig. 11. The effect of neutralizing antibody on the cell proliferation(3rd day).

IV. 총괄 및 고찰

임플란트 치료의 성공여부는 골의 손상과 치유 과정을 거치면서 얻게 되는 골융합의 상태에 달려있다. 임플란트와 골사이의 반응은 일반적인 창상치유 과정을 따르게 된다. 임플란트를 식립하기 위한 수용부의 형성은 인위적으로 골 결손부를 형성하는 행위이며 이는 연속되는 치유과정을 유도한다. 수용부의 형성은 주변 혈관조직 및 골조직의 손상을 가져 오고 조직의 손상과정에서 나온 교원섬유질등이 임플란트 표면에 흡수된다. 이들은 혈액내의 혈소판을 임플란트 표면에 부착되도록 하는 매개체로서 기능

한다. 일단 혈소판의 부착이 일어나면 adenosine triphosphate, serotonin 등과 같은 일련의 응고과정에 연관된 단백질들이 과립을 통해 혈소판으로부터 분비된다. 이 과정은 주변에 존재하는 다른 혈소판들을 손상부위로 유도, 과립을 분비하게 하여 짧은 시간내에 혈괴(blood clot)가 형성되도록 한다. 이렇게 형성된 혈괴는 혈액속의 섬유소 성분에 의해서 더욱 강화가 되어 창상치유과정이 원활하게 이루어질 수 있게 골기질로서 역할을 수행하게 된다. 이 기능이외에도 최근에는 혈소판이 치유과정을 촉진시키고 유지시킬 수 있는 성장요소들을 분비한다는 것이 밝혀졌다.¹⁴⁾

성장요소들은 거의 모든 세포들의 화학주성, 증식, 분화, 기질생성등의 기능을 조절할 수 있는 단백질로 오토크린, 파라크린 방법을 통해서 창상부위의 국소적 조절인자로서 역할을 수행한다. 골결손부의 치유과정에서도 성장요소들은 골형성의 향상을 위해서 상호작용을 하게 된다. 이렇게 증명된 성장요소들의 골형성에 대한 항진효과들은 혈소판농축혈장을 임플란트 치료에 적용시키는데 합당한 근거를 제시한다. 특히 재조합성장요소들을 한, 두개 첨가해서 항진효과를 도모하는 것보다는 혈소판농축혈장은 많은 성장요소들을 한꺼번에 이용할 수 있기 때문에 성장요소 상호간의 보다 효과적인 작용에 의해 더 높은 골형성을 얻을 수 있게 된다.^{15,16)} 이런 성장요소들 간의 상호작용에 의한 효과이외에도 혈소판

농축혈장은 재조합 성장요소에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 우선 재조합 성장요소는 높은 수준의 정제기술이 필요하기 때문에 많은 비용이 들지만 혈소판농축혈장은 환자 자신의 혈액으로 만들기 때문에 비용이 저렴하고 혈액으로 전염되는 병에 감염될 가능성이 없다. 그리고 농축시키는 방법이 수술 전에 간단히 할 수 있어 간편하다. 트롬빈과 염화칼슘을 첨가하면 혈소판농축혈장이 활성화되면서 젤과 같은 점조도를 갖게 되는데 이는 골대체제나 자가골을 첨가해야 하는 경우에 아주 용이한 조작성을 부여한다. 이러한 점조도는 섬유소로 구성된 망상조직에 의해서 만들어지며, 조작성의에도 수술부위의 지혈 효과, 이식체를 다져주는 효과, 외부환경으로부터 보호막을 형성해주는 효과등을 가져온다.^{14,17,18)}

혈소판농축혈장의 창상치유과정에서의 우수성에 대한 보고들이 최근에 많이 발표되고 있다. 하지만 대부분의 연구들은 임상적인 결과를 보고하는 수준이고 아직 혈소판농축혈장의 작용기전에 대해 분석한 보고는 많지 않다. 이에 본 논문은 혈소판농축혈장의 작용기전에 대해서 알아보기 위해서 계획되었다. 세포배양실험을 통해서 혈소판농축혈장의 조골세포에 대한 영향을 알아보고 혈소판농축혈장 내에 있다고 알려진 성장요소와의 관계를 알아보려 하였다. 세포배양실험은 골융합 과정에서 생기는 염증반응, 혈관의 신생 등의 복잡한 환경의 변화를 재현해 내지 못하고 세포의 행동에 영향을 끼칠 수 있는 영양분들을 계속 주어야 하는 문제점들을 가지고 있지만 본 실험에서 주되게 연구되어야 할 혈소판농축혈장내 성장요소들 간의 관계를 파악하기 위해서는 여러 가지 변수들이 정확히 조절되어야 하고 반복적인 실험이 요구되었기 때문에 선택을 하게 되었다.

세포배양실험을 통한 혈소판농축혈장의 효과에 대한 보고는 많지 않다. Slater 등¹⁹⁾은 사람의 혈소판농축제제를 조골세포에 첨가하여 [³H]thymidine의 흡수량상과 세포증식량을 세포배양실험을 통해 비교하였다. [³H]thymidine을 배지에 투여한 후 6일이 지난 후 조골세포의 흡수량을 비교하였는데 혈소판농축제제를 투여한 경우에 10% FBS를 투여한 대조군에 비해서 23.5배의 증가가 나타났다. 50여일에 걸친 배양실험을 통해서 얻은 조골세포층의 두께를 측정 한 결과, 세포층의 구성성분의 비율은 대조군과

큰 차이는 없었지만 두께의 차이는 30일째에 3배 이상이었다고 보고하였다. 이런 결과들은 혈소판농축제제가 조골세포의 원래의 골형성 기능을 일정하게 유지하면서도 증식을 현저히 증가시킬 수 있기 때문이라고 하였다. Kawase 등²⁰⁾은 혈소판농축혈장을 첨가하여 형성된 섬유소용괴가 혈청 없는 배지에서 키운 대조군과는 다르게 치주인대세포의 형태를 많은 위족(pseudopodia)을 가진 크고 분화된 상태로 바꾸고, 제1형 교원질의 합성과 세포외기질로의 분비를 촉진시키는 역할을 한다고 보고하였다. 이런 섬유소용괴의 역할은 혈소판농축혈장내의 성장요소의 효과와 함께 빠르고 양호한 치주조직의 창상치유에 도움을 준다고 보고하였다. 이와 같은 결과들은 임상실험과 동물실험을 통해 보고 되었던 혈소판농축혈장의 효과들과 일치한다.

본 실험도 세포배양실험을 통해서 조골세포에 미치는 영향을 알아 보고자 하였지만 이전의 연구와는 크게 두 가지 면에서 다르다. 첫 번째로는 혈소판농축혈장의 조건배지를 사용하여 조골세포의 성장요소들에 대한 오토크린과 파라크린 효과를 보고자 하였다. 이 실험에서 사용된 조건배지는 혈소판농축혈장이 첨가된 배지에서 조골세포를 2시간가량 배양한 후 그 배지를 씻어 버리고 혈청 없는 배지에 조골세포를 다시 24시간 동안 배양 한 후 모아서 얻게 되었다. 이 배지를 분석하게 되면 혈소판농축혈장이 조골세포의 증식이나 분화단계에 미친 영향을 알게 된다. 즉 단백질을 제거한 배지에 혈소판농축혈장의 영향을 받은 조골세포를 키우게 되면 그 영향에 의해 합성된 단백질을 조골세포가 배지에 분비하게 된다. 이 단백질을 찾아 분석하게 되면 조골세포가 특정 분화단계에서 어떤 물질들을 분비하고 있는지 확인할 수 있으며 또한 이러한 물질들이 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 끼치는지를 알 수가 있게 된다. 두 번째로는 재조합성장요소 및 그의 중화항체를 이용하여 혈소판농축혈장내의 각각의 성장요소들이 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 비교, 평가하고자 하였다.

세포부착분석에서(Table I) 혈소판농축혈장군과 조건배지군에서 현저한 세포부착증가가 관찰되었다. 재조합성장요소를 사용한 경우에 있어서도 전반적인 부착증가가 관찰되었지만 혈소판농축혈장과 조건배지의 효과까지는 일어나지 않았다. 재조합성

장요소들 중에서는 TGF- β 와 IGF-1에서의 증가양상이 많았으며 두 군 간에는 통계적으로 차이는 없었지만($p=0.252>0.05$) IGF-1군이 더 많은 세포부착을 가져왔다. 세포증식분석(Table II, Fig. 7)에서도 혈소판농축혈장군과 조건배지군에서 조골세포의 증식이 현저히 증가되었다. 재조합성장요소들도 역시 세포증식을 유의성 있게 증가시켰으며 그 중에서도 IGF-1군이 제일 많은 세포증식을 가져왔다. 부착과 증식변화에서 혈소판농축혈장군과 조건배지군은 변화양상이 비슷할 뿐 아니라 그 값에 있어서도 비슷하다. 이는 혈소판농축혈장내에 존재하는 조골세포의 활성을 조절하는 단백질이 조건배지 내에서도 같이 비슷한 양으로 존재한다는 것을 말해준다. 즉, 조골세포의 활성에 영향을 준 단백질을 조골세포가 다시 합성, 재분비함으로써 그 자신과 주변세포들에게도 비슷한 활성의 증가를 유도하는 것이다. Fig. 8의 Western blot 분석은 이를 뒷받침해준다. 혈소판농축혈장과 조건배지 모두에게서 대조군과 다르게 bFGF, IGF-1, PDGF를 나타내는 띠가 같은 정도의 두께를 가지고 나타났다. 이는 두 실험 군에 존재하는 단백질이 같다는 것을 의미한다. 즉, 혈소판의 성장요소를 통해서 전해진 자극은 곧바로 조골세포에게 반응을 유도하고 동시에 그 자극이 지속적이고 심화될 수 있게 조골세포가 성장요소를 재분비하게 되고, 분비된 성장요소들은 조건배지의 결과에서 보듯이 또 다른 조골세포의 활성을 조절하게 된다. 이런 조골세포의 성장요소에 대한 오토크린, 파라크린 효과가 창상치유과정 초기에 세포의 활성을 최대로 유지할 수 있게 한다고 생각된다.

재조합 성장요소들을 단독으로 투여한 경우에 정도의 차이는 있었지만 전반적인 조골세포의 부착과 증식의 증가가 일어났다. 하지만 그 증가량은 혈소판농축혈장과 조건배지에 미치지 못하는데 이는 특정성장요소에 의해 전적으로 조골세포의 활성이 조절되지 않으며 성장요소들간의 상승효과에 의해서 혈소판농축혈장과 조건배지의 효과가 나타난다는 것을 알려준다. 중화항체를 첨가한 세포부착 및 증식분석에서 이를 확인할 수 있었다. 세포부착분석에서(Table III) 혈소판농축혈장에 중화항체를 넣지 않은 실험군의 부착증가량(108.4%)에 대해서 ab-IGF-1을 투여한 군은 약 91.7%, ab-TGF- β 는 약 68.8%가, ab-bFGF군은 약 50.2%, ab-PDGF군은

31.1%의 감소를 가져왔지만 부착증가량전체를 다 감소시키지는 못했다. 증식분석에서도(Table IV, Fig. 9, 10) 항체를 넣지 않은 실험군의 증가량(160.85%)에 비해 ab-IGF-1을 첨가한 경우에는 약 97.9%, ab-TGF- β 는 약 78.3%, ab-bFGF는 약 74.4%, ab-PDGF는 약 39.6%의 증식량의 감소를 보였지만 증가량을 다 감소시키지는 못했다. 조건배지군에서도 이와 비슷한 세포부착과 증식의 감소가 관찰되었다. 이런 결과들은 혈소판농축혈장의 조골세포 활성에 대한 영향이 전적으로 한 성장요소에 의해서만 좌우되지 않으며 성장요소들간의 상호작용에 의해서 효과가 발휘된다는 것을 알려준다.

본 실험에서 사용한 성장요소들로는 골기질에 많은 양이 발견되는 대표적인 4가지를 사용했다. 이중 PDGF, TGF- β , IGF-1은 혈소판의 과립에서도 많이 발견된다. 하지만 bFGF는 조골세포에서 합성, 분비되고 있다는 것은 밝혀졌지만 아직까지는 혈소판과립에 존재한다는 증거는 없다.⁵⁶⁾ 하지만 본 실험에서는 Western blot을 통해서 혈소판농축혈장과 조건배지에는 bFGF가 발현되고 있었으며, 세포부착 및 증식분석에서 bFGF에 대한 중화항체를 넣었을 때 세포부착 및 세포증식의 감소가 관찰되었다. 이런 현상에 대한 이유로 혈소판의 과립에 bFGF가 존재할 수 있는 가능성과 혈소판농축혈장의 다른 요소들이 조골세포로 하여금 bFGF를 합성, 분비하도록 조절한다는 가능성을 생각할 수 있다. 이에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 듯하다.

혈소판농축혈장의 성장요소의 효과를 다룬 많은 문헌들은 여러 성장요소들 중 가장 많은 양으로 존재하는 PDGF, TGF- β 의 생물학적 효과에 대해서 보고하고 있다. Marx등¹⁰⁾은 88명의 환자에게서 얻은 혈소판농축혈장에 항체를 이용하여 염색한 결과 많은 양의 PDGF, TGF- β 가 농축되어 있음을 알 수 있었고 자가 이식제내에서도 이 성장요소를 이용할 수 있는 다량의 수용체들이 혈관 및 해면골질에 집중되어 있음을 보고하였다. Okuda등²¹⁾도 혈소판농축혈장내의 TGF- β , PDGF의 농도를 측정하고 생물학적 활성을 평가한 결과 TGF- β 의 생물학적인 활성이 혈소판농축혈장의 생물학적 활성과 거의 대등하다고 보고하였다. 하지만 본 세포배양실험을 통해서 PDGF, TGF- β 보다 IGF-1의 혈소판농축혈장내의 생물학적 효과가 더 우수하다는 것을 알 수가 있었

다. 같은 농도의 재조합성장요소를 투여하여 조골세포의 활성화에 대한 효과를 비교한 실험에서 IGF-1을 투여한 경우에 가장 높은 세포부착과 증식이 관찰되었으며 중화항체를 이용한 실험에서도 ab-IGF-1을 투여한 경우가 제일 높은 세포부착과 증식의 감소를 가져왔다. 이는 혈소판농축혈장속에서 조골세포의 활성을 가장 효과적으로 조절하는 성장요소가 IGF-1임을 말해 준다. 이러한 결과에 대해서 생각할 수 있는 첫 번째 이유로는 조골세포의 활성화에만 초점을 맞춘 세포배양실험의 한계 때문이라 생각된다. 성장요소들의 조골세포에 대한 영향은 서로 비슷해서 겹치는 부분들이 많지만 영향을 끼치는 주된 영역은 각각 다르다.²³⁾ 실제로 PDGF는 창상치유과정의 초기에 관련되어 혈관의 생성, 대식세포의 활성화 등을 촉진시키는 역할들을 수행하면서 치유가 활발히 일어날 수 있는 조건을 만들며, TGF- β 도 조골세포의 전구세포의 화학주성 및 세포분열을 촉진시키고, 내피세포의 화학주성 및 혈관생성을 활발하게 하여 활성화된 주변여건을 더욱 견고히 하는 역할을 한다. 이러한 역할들은 간접적으로 조골세포의 활성화에 도움을 주게 되지만 세포배양실험상에서는 그러한 주변상황의 변화를 통한 간접적인 효과를 재현해 내기 어렵기 때문에 가장 직접적으로 조골세포의 활성을 오토크린, 파라크린 방법으로 유도하는 성장요소로 알려진 IGF-1이 제일 큰 영향을 끼치는 인자로 나타난 것 같다. 두 번째로 생각할 수 있는 이유는 혈소판농축혈장내에 존재하는 성장요소들의 농도에 대한 고려가 없었기 때문인 것 같다. 본 실험에서는 재조합성장요소들의 상호간의 효과를 비교하기 위해서 같은 농도를 사용해서 그 결과를 보았다. 하지만 여러 문헌들에 의하면^{7,21,23,24)} TGF- β 나 PDGF가 혈소판농축혈장에서 가장 많은 농도로 검출되고 IGF-1은 2-3배정도 적은 양으로 존재한다고 한다. 아울러 성장요소들은 주변의 환경상황과 세포의 분화상태, 농도에 따라서도 다르게 작용하기 때문에^{25,26)} 농도를 고려하지 못한 것이 이런 결과를 가져왔다고 생각할 수 있다. 혈소판농축혈장내 성장요소들의 농도와 상호작용에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

Fig. 11은 광학 현미경을 통해서 3일째 되는 세포들의 형태를 관찰한 것이다. Holtrop 등²⁷⁾에 의하면 비활동성인 조골세포는 평평하고 가늘고 긴 형태를

띠지만, 활동성인 조골세포는 둥글고 부풀어진 형태를 취한다고 하였다. 대조군은 혈청 없는 배지에 다 키운 세포인데 원래 분주하기전의 세포의 형태와 비슷하게 길고 가늘면서 세포돌기의 발달이 낮은 비활동성인 조골세포의 특징을 띠었다. 하지만 혈소판농축혈장군과 조건배지군에서는 세포들이 많은 세포돌기들을 내놓고 서로 연결되어 있었으며 세포의 형태가 둥근형태에 가까워지는 활동성인 조골세포의 특징이 나타났다. 재조합성장요소인 경우에도 대조군에 비해 세포들이 둥글면서 부풀어져 있었고 세포돌기가 발달되어 있는 것을 관찰할 수 있었지만 혈소판농축혈장군과 조건배지에서 관찰되는 양상은 아니었다. 이는 여러 성장요소들의 상호작용이 일어나는 혈소판농축혈장이 단독의 성장요소들보다 조골세포의 활성화에 더 큰 영향을 끼친다는 것을 의미한다.

본 실험에 사용된 혈소판농축혈장의 농도와 재조합성장요소들의 농도는 선행연구를 통해 결정하였다. 세포부착분석과 증식분석을 용이하게 할 수 있고 조골세포의 활성을 유의할 수준으로 증가시킬 수 있는 농도를 실험군으로 삼았다. 그리고 성장요소의 농도도 혈소판농축혈장의 생물학적 효과를 넘어서지 않는 선에서 가장 비교하기 좋은 농도를 선택하였다. 하지만 여러 문헌들에 의하면^{7,21,23,24)} 혈소판농축혈장내에는 성장요소들이 서로 다른 농도로 존재하고 있으며 성장요소들도 주변의 환경상황과 세포의 분화상태, 농도에 따라서도 다르게 작용하기 때문에^{25,26)} 혈소판농축혈장과 조건배지내의 실제 성장요소의 농도에 대한 분석 없이 성장요소들의 효과를 비교한 것은 본 연구의 가장 큰 제한점이다. 아울러 창상부위를 주변과 격리시켜 세포활성을 더 높일 것이라 생각되는 혈소판농축혈장의 응고되는 성질과 조골세포의 활성화를 위해 주변 여건을 활성화시키는 성장요소들의 역할을 실험상에 재현해내지 못한 것이 본 실험에서의 또 다른 제한점이다. 이를 위한 더 많은 연구와 배양기술의 개발이 필요하다고 생각된다.

위의 제한점에도 불구하고 여러 임상실험결과 및 동물실험, 본 실험결과를 종합해보면 혈소판농축혈장은 혈소판내의 성장요소들의 상호간의 상승효과와 조골세포의 성장요소에 대한 오토크린, 파라크린 효과를 이용하여 창상치유 초기에 세포활성을 극대

화하여 골형성을 촉진시킨다고 결론내릴 수 있다. 이는 골질이 불량한 곳에 임플란트를 식립할 때 혈소판농축혈장을 함께 사용하면 치유기간 초기에 임플란트 주변 골재생을 빠르게 촉진함으로써 치유기간을 단축시킬 수 있음을 의미한다.

V. 결 론

혈소판농축혈장이 창상치유를 촉진한다는 것이 많은 연구를 통해서 알려졌다. 이런 치유능의 향상은 혈소판내의 성장요소들에 의한 것인데 대부분의 연구는 임상연구에 국한되어 있다. 이에 본 논문은 혈소판농축혈장이 골형성 능력을 향상시킬 수 있는 것은 혈소판에 내재된 성장요소들과 깊은 연관이 있을 것이라는 가정을 설정하고 세포배양실험을 통해서 성장요소들과 혈소판농축혈장의 골형성 능력과의 연관관계를 알아보고자 계획되었고 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 혈소판농축혈장의 조건배지가 조골세포주에 미치는 영향은 혈소판농축혈장과 비슷하였다.
2. 세포부착분석에서 혈소판농축혈장, 조건배지, 재조합성장요소인 TGF- β , IGF-1, bFGF군이 대조군에 비해 유의성(p<0.05)있게 조골세포주의 세포부착을 증가시켰다. 세포증식분석에서는 혈소판농축혈장, 조건배지, 재조합성장요소인 TGF- β , IGF-1, bFGF, PDGF군이 대조군에 비해 유의성(p<0.01) 있게 조골세포주의 세포증식을 증가시켰다. 재조합성장요소들 중에서는 IGF-1이 세포부착과 증식에 가장 영향이 컸다.
3. 혈소판농축혈장과 조건배지에서는 성장요소인 IGF-1, bFGF, PDGF가 발현되었다.
4. 성장요소 중화항체를 혈소판농축혈장과 조건배지에 투여한 경우, ab-TGF- β , ab-IGF-1군에서 유의성(p<0.05)있게 부착감소를 나타내었고, ab-TGF- β , ab-IGF-1, ab-PDGF, ab-bFGF군 모두에서 유의성(p<0.05)있게 증식감소를 나타내었다. 세포부착과 증식의 감소량은 ab-IGF-1군에서 가장 컸다.
5. 광학현미경 분석에서 대조군은 가늘고 긴 형태를 띠고 세포돌기의 발달이 더딘 반면에 실험군에서는 둥글고 부풀어진 형태와 잘 발달된 세포돌기들이 관찰되었다. 특히 혈소판농축혈장군과 조건

배지군에서의 발달형태는 다른 군에 비해 현저한 차이를 보였다.

이상의 결과에서 혈소판농축혈장은 혈소판내에서 성장요소들의 상호간의 상승효과와 조골세포의 성장요소에 대한 오토크린, 파라크린 효과를 이용하여 창상치유 초기에 세포활성을 극대화함으로써 골형성을 촉진시킨다고 생각한다. 이는 골의 양이 부족하거나 골질이 좋지 않은 곳에 임플란트를 식립할 때 혈소판농축혈장을 적용하면 치유기간 초기에 임플란트주변 골형성을 촉진하여 보다 빠르고 양호한 골융합을 얻을 수 있음을 의미한다.

참고문헌

1. Albrektsson T, Brånemark PI, Hanson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Acta Orthop Scand 1981;52:155-77.
2. Wittbjer J, Rohlin M, Thorngren KG. Bone formation in demineralized bone transplants treated with biosynthetic human growth hormone. Scan J Plast Reconstr Surg 1983;17:109-18.
3. Zilch H, Noffke B. Beeinflusst der Fibrinkleber die Knochenneobildung. Unfallheilkunde 1981;84:363.
4. Park JB, Young SO, Kenner GH. Dental implant fixation by electrically mediated process. Biomater Med Devices Artif Organ 1978;6:291.
5. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 1988;81:277-81.
6. SN, Bostrom MPG, Lane JM. Bone growth factors. Orthop Clin North Am 2000; 31:375-87.
7. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods : Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. Int J Oral Maxillofac Implants 2002;17:184-90.

8. Marx RE. Platelet-rich plasma : A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, eds. Tissue engineering: application in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence. 1999:71-82.
9. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry* 2001;10:225-28.
10. 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;85:638-46.
11. 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;14:529-35.
12. Rosenberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma - initial case presentation. *Pract Periodont Aesthet Dent* 2000;12:843-50.
13. 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;20:487-97.
14. Carlson NE, Roach RB. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc* 2002;133:1383-86.
15. Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurtá D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:227-35.
16. Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS. An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 2003;12:24-34.
17. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-99.
18. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59:1119-21.
19. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995; 13:655-63.
20. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74:858-64.
21. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74:849-57.
22. Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RGK, Minne HW, Ziegler R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factor: A comparison between insulin-like growth factor-1, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β . *Endocrinology* 1990;127:69-75.
23. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with

- preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:357-62.
24. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio-Maxillofac Surg*. 2002;30:97-102.
25. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat parietal bone. *Endocrinology* 1989; 125:13-9.
26. 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;39:487-96.
27. Holtrop ME. Light and electron microscopic structure of bone-forming cells. In: Hall BK, editor. *The osteoblast and osteocyte. Bone*, vol. 1. Caldwell(NJ):Telford Press; 1990. p.1-39.

Reprint request to:

Yung-Soo Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Dept. of Prosthodontics, College of Dentistry, Seoul National University
28-1 yeongun-dong, chongno-gu, 110-749, Seoul, Korea
yungskim@snu.ac.kr

사진부도 ①

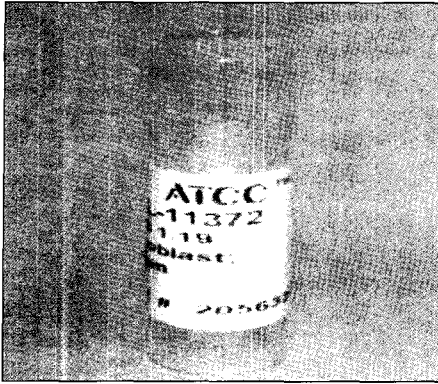


Fig. 1. Osteoblast cell line

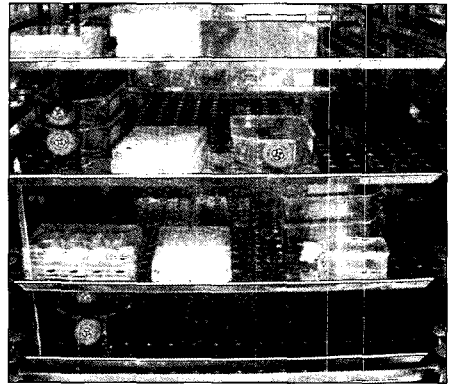


Fig. 2. Multigas CO₂ incubator

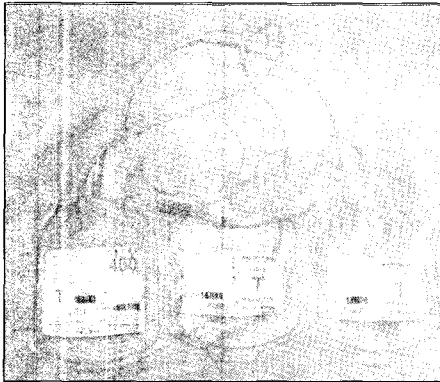


Fig. 3. Blood collection bag

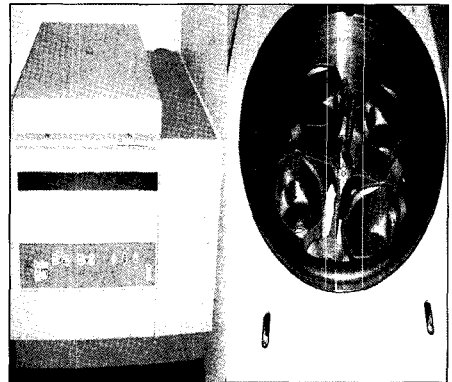


Fig. 4. IEC central GPR centrifuge

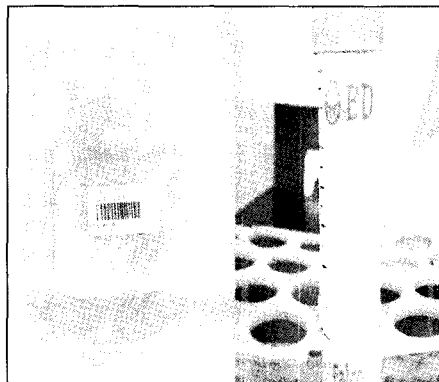


Fig. 5. Platelet Rich Plasma

사진부도 ②

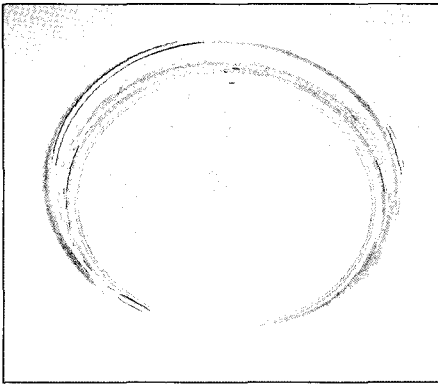


Fig. 6. Conditioned medium of PRP.

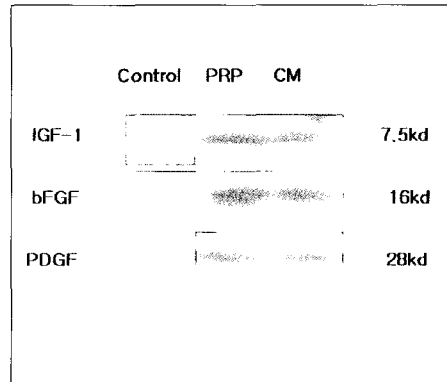
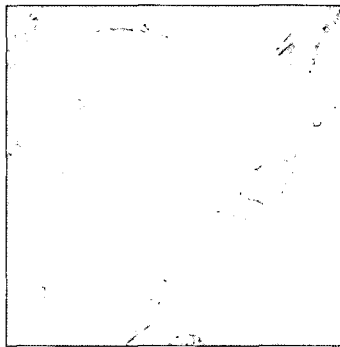


Fig. 8. Western blot assay



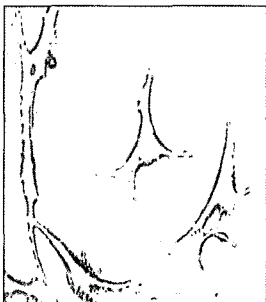
(A)



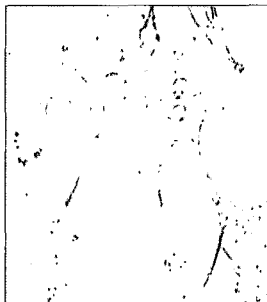
(B)



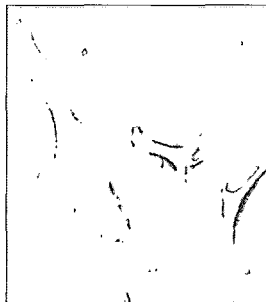
(C)



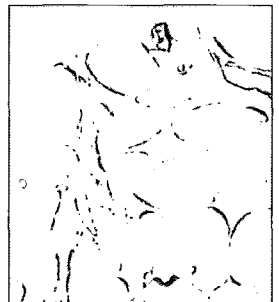
(D)



(E)



(F)



(G)

Fig. 11. Light microscope for cell morphology.

(A) control: the cells were flattened and elongated with a few cellular processes.

(B) PRP, (C) PRP-CM, (D) bFGF, (E) IGF-1, (F) PDGF, (G) TGF- β : the cells appeared as spherical, plump cells with well developed cellular processes. Especially, the cells in PRP and PRP-CM had more prominent developed features than recombinant growth factor groups.

ABSTRACT

THE EFFECT OF GROWTH FACTORS IN PLATELET-RICH PLASMA ON THE ACTIVITY OF OSTEOBLAST CELL LINE

Tae-Wook Jung, D.D.S., M.S.D., Yung-Soo Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D., M.Sc.(O.S.U.)
Chang-Whe Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Kyung-Soo Jang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Young-Jun Lim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Prosthodontics, College of Dentistry, Seoul National University

Statement of problem: Platelet-rich plasma (PRP) is well known to be very effective method to stimulate and accelerate the healing of bone and soft tissue. However, there are few reports which deal with the mechanisms of the PRP on the activation of the osteoblasts.

Purpose: This study was aimed to investigate the effect of growth factors in PRP on the activity of osteoblasts.

Material and method: To evaluate the effect on human, human osteoblast cell line was cultured. PRP was extracted from the blood of a healthy volunteer. Using the recombinant growth factors of PDGF, TGF- β , IGF-1, bFGF which are mainly found at bone matrix and their neutralizing antibody, the effect of PRP on the attachment and proliferation of osteoblasts was evaluated. To evaluate the autocrine and paracrine effects, conditioned media (CM) of PRP was made and compared with PRP. By the western blot analysis, the expression of growth factors in PRP, CM was examined. Cell morphology was compared by the light microscope.

Results:

- 1) The effects of CM on osteoblast were similar to the effects of PRP.
- 2) PRP, CM, recombinant TGF- β , bFGF, IGF-1 showed significantly higher cellular attachment than control ($p < 0.05$) in the cell attachment assay. In the cell proliferation assay, PRP, CM, recombinant TGF- β , IGF-1, bFGF, PDGF increased significantly cell proliferation ($p < 0.01$). Among the recombinant growth factors, IGF-1 showed the highest cellular attachment and proliferation.
- 3) In the western blot assay, bFGF, IGF-1, PDGF were equally expressed in PRP and CM.
- 4) The attachment of osteoblast cell decreased significantly after the addition of neutralizing antibody against TGF- β , IGF-1 ($p < 0.05$). In the cell proliferation assay, the addition of neutralizing antibody against TGF- β , bFGF, PDGF, IGF-1 decreased significantly the cellular proliferation ($p < 0.05$). The amount of decreasing in the cell attachment and proliferation is the highest in ab-IGF-1.

5) The cells in control group were flattened and elongated with a few cellular processes in the a light microscope. But, the cells appeared as spherical, plump cells with well developed cellular processes in experimental groups. The cells in PRP and CM had more prominent developed features than recombinant growth factor groups.

Conclusions: These findings imply that PRP maximize the cellular activity in early healing period using the synergistic effect, autocrine, paracrine effects of growth factors and increase the rate and degree of bone formation.

Key words : Platelet-rich plasma, Conditioned medium, Growth factors, Autocrine, Paracrine