

가토 두개골 결손부에 이식된 β -TCP의 골치유 과정에서 PRP의 효과에 관한 연구

이성훈 · 황경균 · 박창주 · 임병섭 · 조정연 · 백승삼* · 심광섭
한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, *한양대학교 의과대학 병리학교실

Abstract

THE EFFECT OF PRP ON THE BONE REGENERATION OF β -TCP GRAFTED IN RABBIT CRANIAL BONE DEFECT

Soung-Hoon Lee, Kyung-Gyun Hwang, Chang-Joo Park, Byung-Sup Lim, Jung-Yeon Cho,
Seung-Sam Paik*, Kwang-Sup Shim

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hanyang University

**Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University*

Purpose : Platelet rich plasma (PRP) is an autologous material with many growth factors, such as BMPs, PDGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 , VEGF, and IGF, facilitating bone healing process. The prominent osteoconductive activity and the biodegradable nature of beta-tricalciumphosphate (β -TCP) for bone grafts in animal experiments have been reported. The purpose of this study was to evaluate the effect of PRP on the osteogenesis of β -TCP.

Materials & Methods : Two artificial calvarial bone defects were made in 32 rabbits which were divided into 2 groups. In one group of 16 rabbits, autogenous bone / β -TCP was grafted on each side of cranial bone defect. In the other group of 16 rabbits, mixture of β -TCP and PRP / PRP alone was grafted on each side of the cranial bone defect. The animals were sacrificed at 2, 4, 8, and 12 weeks after surgery. The specimens were harvested and examined histologically and immunohistochemically by the expression of BMP2/4/7, PDGF, VEGF and TGF- β_1 .

Results : The mean volume of new bone formation was significantly higher at 4, 8, 12 weeks in autogenous graft than that in β -TCP. The BMP2/4 expression was significantly higher at 4 weeks in autogenous bone graft and at 4 weeks in mixture of β -TCP and PRP and at 12 weeks in β -TCP. The expression of BMP7, PDGF, VEGF and TGF- β , showed no significant difference in autogenous, β -TCP, mixture of β -TCP and PRP, and PRP alone during grafted bone regeneration.

Conclusion : The results showed that PRP had no additional value in promoting healing process of β -TCP grafts.

Key words: PRP, β -TCP, Rabbit cranial bone, Bone graft

1. 서 론

구강악안면영역의 골결손으로 인해 인공치아의 식립에 제한을 받게 되는 경우, 자가골, 동종골, 이종골, 합성골 등을 이용하여 골증대술을 시행하게 된다. 자가골은 골재생에 필

요한 비계, 세포, 성장 효소의 복합체로서 골유도능과 골전도능의 모든 것을 갖춘 효과적인 골이식재료이다. 그러나 자가골은 이식골 채취를 위한 부가적인 수술과 감염의 위험, 수술 시간의 증가, 공여부의 이차적인 흉터의 발생, 필요한 골량의 제한, 환자의 불편감과 불안 등으로 인해 한계

가 있다. 이를 해결하기 탈회동결건조골, 동결건조골, 이중골 등을 임상에서 많이 사용하고 있다. 그러나 후천성면역결핍증후군의 발생, 오염된 혈액과 조직을 통한 전염, 다른 종으로부터의 질병의 전염 등 많은 문제점으로 인해 최근 여러 나라에서 사용을 엄격히 규제하고 있는 상황이다. 이로 말미암아 생체친화성이 우수한 수산화인회석(hydroxyapatite, HA), 생체유리, 생체도재, 중합체(polymer) 등의 합성 골대체제물들이 개발되고 실제 임상에서 사용되고 있다^{1,2)}.

Bahn³⁾이 calcium-sulfate를 인공대체물로 사용한 이후, 수산화인회석, 생체유리, 생체도재 등 골구조와 유사한 많은 재료들이 연구 개발되고 있다. 생체 내에 존재하는 수산화인회석 결정은 순수한 수산화인회석과는 달리 반응성이 높아서, 최근에는 생체 내에서 반응성이 높은 수산화인회석이나 생체도재 등에 대한 연구가 활발히 진행 중이다¹⁾. Beta-tricalciumphosphate(β -TCP)는 미세기공을 가진 생체활성 재료로 수산화인회석보다 높은 용해도를 보이며, 용출, 흡수의 과정을 거쳐 자가골로 치환될 수 있다고 보고된다^{4,5)}. 하지만, β -TCP는 인공골 대체재료로 직접 골형성을 일으키기 보다는 골형성세포가 기능을 할 수 있는 생체적 환경을 조성해 주는 역할 즉, 비계의 역할이 주된 기능이다. 따라서 β -TCP를 포함한 인공골 대체재료가 자가골과 유사한 기능을 발휘할 수 있도록 골형성세포를 직접 유도할 수 있는 성장인자의 첨가나 골형성세포를 직접 배양해서 이식하는 추가적인 시도 및 연구가 이루어지고 있다.

혈소판 농축혈장(platelet-rich plasma: PRP)은 Tayapongsak 등⁶⁾이 하악골 재건에 autologous fibrin adhesive (AFA)를 사용했으며, Marx⁷⁾는 하악골 결손이 있는 환자들에게 골이식술 시 혈소판 농축혈장을 겔(gel)상태로 만들어 사용한 결과 혈소판 농축혈장이 골형성을 촉진한다는 임상적 연구 결과를 보고한 바 있다. 혈소판 농축혈장은 많은 연구들에서 혈관 신생능력과 지혈 효과, 항 감염 효과, 골이식 시 형태의 조각의 용이성, 성장 인자 함유로 인한 골 이식체의 초기 치유 속도 촉진 효과 등이 보고된다. 혈소판 농축혈장은 platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-beta (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), epithelial growth factor (EGF)의 7가지 성장인자를 포함하고 있다고 알려져 있다⁷⁻¹¹⁾. 이들 여러 가지 성장인자들이 골의 치유 과정을 촉진시켜 주며, 이식골 치유 과정 시 신생혈관 형성, 세포화학주성 및 분열촉진, 줄기세포(stem cell) 증식, 골편간 결합력 제공, 피브린 망을 통한 골 전도율을 증가시키는 역할을 함으로써 초기 골 재생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 하지만, 지금까지의 혈소판 농축혈장에 관한 연구는 인공골대체물과의 혼합이식 후 골형성의 여부와 골형성의 양적인 면에 초점을 맞추어 왔으나, 혈소판 농축혈장

에 포함된 골형성 촉진인자들이 이식 후 골형성을 촉진하기 위한 성장인자로의 기능에 대한 분자생물학적인 연구들은 드문 실정이다. 이에 본 연구는 가토의 두개골 결손부에 자가골, β -TCP와 혈소판 농축혈장을 각각 이식하여, 신생골의 형성 및 흡수는 조직계측학적 방법을 이용하여 비교 관찰하고, 골형성 촉진 성장인자인 BMP2/4/7, PDGF, TGF- β , VEGF가 발현하는 시기와 양상은 면역조직화학염색법을 이용하여 비교 관찰함으로써 혈소판 농축혈장이 합성골의 골형성 촉진에 관련된 기전을 밝힘과 동시에 효율적인 임상적용에 도움이 되고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

체중 평균 3.0kg인 생후 8주 정도의 New Zealand White 가토 32 마리를 두 군으로 나누어 가토 두개골에 두 개의 골결손부를 형성하여 가토 16마리의 두개골 우측에는 자가골을, 좌측에 β -TCP (Cerasorb[®], Curasan)를 이식하고, 다른 가토 16마리의 두개골 우측에 β -TCP와 혈소판 농축혈장의 혼합물을, 좌측에 혈소판 농축혈장을 단독으로 이식하였다. 2, 4, 8, 12주당 각각 4마리를 희생시켰다. 동물실험은 한양대학교 동물실험 윤리규정을 따랐다.

2. 연구방법

1) 수술방법

혈소판 농축혈장을 준비한 후 염산케타민(Ketamine[®], 유한양행) 1 ml와 xylazine (Rumpun[®], 한국바이엘) 1 ml를 근육 주사하여 마취를 유도하였다. 가토 두정부를 삭모하고 베타딘으로 소독하였다. 수술 중 지혈을 목적으로 10만 배 희석한 에피네프린이 함유된 2% 리도케인을 수술 부위에 주사하였다. 두개 정중부에 절개선을 주어 두개골의 봉합부를 노출시켰다. 골막하바리는 양쪽 안와상연까지 골막에 손상을 주지 않게 시행하였다. 노출된 두개골에 봉합선을 피하여 뇌경막에 손상을 주지 않도록 조심하면서 low speed round bur (106 Komet[®], Germany)로 직경 13 mm의 원형 결손부를 두개골 봉합선에 대칭되게 두 곳에 형성하였다. 결손부에 자가골, β -TCP, β -TCP + 혈소판 농축혈장, 혈소판 농축혈장 단독을 각각 이식하였다(Fig. 1). 골막은 4-0 catgut으로 피부는 3-0 silk로 봉합하였다. 수술 후 당일과 이틀까지 감염 예방을 목적으로 겐타마이신(Gentamycin[®], 동화약품) 2 ml를 근주하였다.

2) 혈소판 농축혈장

혈소판 농축혈장은 마취를 시행하기 전 대상 가토 귀의 이

개정맥(intermedial branch of the caudal auricular vein)에서 혈액 10 ml를 21G 정맥 catheter로 채혈하고 (Fig. 2) 2 ml CTG®(Korea United Pharmacy, Korea)에 혼합하여 용기에 보관하였다. 채취된 혈액이 들어간 튜브와 이에 상응하는 생리식염수를 채운 균형 튜브를 천칭을 이용하여 무게 균형을 맞추고 2000 g로 3분 동안 첫 번째 원심분리를 시행하였다(PLACON®, Oscotec)(Fig. 3, 4). 상부 투명 혈장층과 연층을 함께 분리 채취하고 척추마취용 주사바늘을 사용하여 새로운 튜브에 넣었다. 여기에 상응하는 균형 튜브의 무게를 천칭을 이용하여 맞춘 후 5000 g로 5분 동안 두 번째 원심분리를 시행하였다(Fig. 5). 원심분리 후 연층을 포함하여 약 1.5 ml의 농축 혈소판액을 채취하였다. Thrombin (디라빈®, Korea United Pharmacy) 분말에 calcium gluconate (칼미아®, Korea United Pharmacy) 용액을 1:1의 비율로 넣어 혼합액을 제조하였다. 사용할 β -TCP (0.25g)(Fig. 6)를 채취된 혈소판 농축액으로 충분히 적셨다. 디라빈 분말과 칼미아 혼합액을 혈소판 농축혈장에 넣고 기구로 겔 상태가 될 때까지 천천히 저어 주었다.

3) 조직학적 관찰

각 군을 실험 후 2, 4, 8, 12주 간격으로 희생하여, 비전 두봉합선을 경계로 두경부를 절단 후 4% paraformaldehyde로 고정을 시행하였다. 탈회는 0.1 M 인산완충용액으로 30분간 수세하여 0.1 M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA로 실온에서 80일 간 탈회 하였다. 포매와 박절을 통해 표본으로 만들고 H&E 염색으로 염색한 후 광학 현미경을 통해 검정하였다.

4) 조직계측학적 평가

각 군에서 생성된 섬유조직과 신생골의 양을 평가하기 위해 슬라이드 표본에서 무작위로 세 곳을 선택하여, 100배의 광학 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 영상을 얻은 다음 계측 프로그램(OPTIMUS 6.5 System, Netherlands)을 이용하여 전체면적 중 잔존골, 신생골, 연조직이 차지하는 비율을 백분율로 산출하여 세 곳의 평균값을 계산하였다. 각 군의 신생골이 차지하는 비율은 SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA 분석으로 신뢰수준 95%에서 각각의 결과를 비교하여 군들 간의 유의성을 평가했다.

5) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학 염색과 슬라이드 제작을 위하여 streptavidin-biotin법을 이용하였다. 먼저 박절편을 xylene으로 탈파라핀화하고 각 단계의 알콜을 거쳐 합수시켰다. 증류수로 3회 세척한 후 전처리로 0.01 M sodium citrate buffer

(pH 6.0)용액에 담근 상태에서 microwave로 5분씩 2회 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수 용액으로 10분간 처리 후 증류수와 phosphate buffered solution (PBS)로 세척하였다. DAKO LSAB kit (DAKO, USA)의 blocking 시약으로 20분간 부란시켜 비특이적 IgG의 결합을 방지하였다. 그리고 상온에서 각각 BMP2/4/7, PDGF, VEGF, TGF- β ,의 일차항체로 1시간 이상 부란 시킨 뒤 PBS로 3회 세척하였다. 일차항체로 polyclonal goat anti-BMP2/4/7 (SantaCruz, USA)과 anti-PDGF (SantaCruz)와 anti-VEGF (SantaCruz) 그리고, anti-TGF- β , (SantaCruz)을 각각 1:50으로 희석하여 사용하였다. 이 후 biotin이 표지된 이차항체로 15분간 부란한 후 PBS로 3회 세척하였다. Peroxidase가 표지된 streptavidin으로 15분간 부란시키고 PBS로 충분히 세척하였다. 조직은 갈색의 DAB (3,3-diaminobenzidine)로 5분간 발색시킨 후 증류수로 충분히 세척하였고 Meyer's hematoxyline으로 대조염색한 후 permount로 봉입하여 광학 현미경하에서 관찰하였다. 각각의 슬라이드 염색에 대하여서 염색이 된 경우를 양성으로 판독하였고, 염색의 정도에 따라 4단계로 나누어 표현하였다. 염색된 부분이 전체의 0-5%인 경우를 (+/-), 6-25%인 경우를 (+), 26-50%를 (++), 50%이상인 경우를 (+++)로 하여 2인의 병리학 전문의가 각각 판독한 바를 종합하여 판정하였다.

III. 연구 결과

1. 조직학적 관찰

1) 자가골 이식군

- (1) 2주 : 이식골 주위로 약간의 신생골 형성이 관찰되었고, 조골세포와 섬유아세포의 증식이 관찰되었다.
- (2) 4주 : 이식골 주위로 신생골의 생성이 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 이식골 주변으로 다수의 핵을 가진 식세포(phagocyte)들의 활성이 관찰되었다(Fig. 7).
- (3) 8주 : 이식골 주위로 신생골의 생성이 많이 관찰되며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 이식골은 대부분 신생골로 둘러싸여 있으며, 식세포들의 활성은 관찰되지 않았다.
- (4) 12주 : 이식골 주위로 많은 신생골의 생성이 관찰되어, 이식골은 완전히 신생골로 둘러싸여 있는 것이 관찰되었다. 하지만, 신생골 주위의 조골세포들의 활성을 보이지 않고, 전체적으로는 신생골의 생성보다는

골개조현상이 일어난 것으로 관찰되었다(Fig. 8).

2) β -TCP와 혈소판 농축혈장 이식군

- (1) 2주 : 이식된 β -TCP주위에 많은 섬유아세포와 대식세포가 둘러싸고 있었으나, 신생골의 형성은 관찰되지 않았고, 결손부의 변연부에서만 적은 신생골 생성이 관찰되었다.
- (2) 4주 : 이식된 β -TCP주변으로 많은 다수의 핵을 가진 식세포들의 활성이 관찰되고, 이들 주변으로 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 골변연부의 β -TCP외에는 신생골의 생성은 관찰되지 않았다(Fig. 9).
- (3) 8주 : 이식된 β -TCP주변으로 신생골의 생성이 관찰되었으며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 다수의 핵을 가진 식세포들의 활성은 β -TCP주변으로 관찰되었다.
- (4) 12주 : 이식된 β -TCP주변으로 왕성한 신생골의 형성이 관찰되어, 이식된 β -TCP를 완전히 둘러싸는 신생골이 서로 연결된 것이 관찰되었다. β -TCP주변으로 간간히 다수의 핵을 가진 식세포들이 관찰되었다. 일부 β -TCP는 흡수되어 작은 크기로 관찰되고, 신생골의 주변으로는 활성화된 조골세포와 혈관이 많은 결체조직들이 관찰되었다(Fig. 10).

3) β -TCP 이식군

- (1) 2주 : 이식된 β -TCP주위에 많은 섬유아세포와 대식세포가 둘러싸고 있었으나, 신생골의 형성은 관찰되지 않았고, 결손부의 주변의 자가골과 인접한 부분에서만 적은 신생골의 형성이 관찰되었다.
- (2) 4주 : 이식된 β -TCP주변으로 많은 다수의 핵을 가진 식세포들의 활성이 관찰되고, 이들 주변으로 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 골변연부의 β -TCP외에는 신생골의 생성은 관찰되지 않았다(Fig. 11).
- (3) 8주 : 이식된 β -TCP주변으로 신생골의 생성이 일

나며, 신생골의 주위로 조골세포와 활성화된 섬유아세포와 혈관내피세포의 증식이 관찰되었다. 다수의 핵을 가진 식세포들의 활성은 β -TCP주변으로 관찰되었다.

- (4) 12주 : 이식된 β -TCP주변으로 왕성한 신생골의 형성이 관찰되어, 이식된 β -TCP를 완전히 둘러싸는 신생골이 서로 연결된 것이 관찰되었다. β -TCP주변으로 간간히 다수의 핵을 가진 식세포들이 관찰되었다. 일부 β -TCP는 흡수되어 작은 크기로 관찰되고, 신생골의 주변으로는 활성화된 조골세포와 혈관이 많은 결체조직들이 관찰되었다(Fig. 12).

4) 혈소판 농축혈장 이식군

- (1) 2주, 4주, 8주, 12주 모두 신생골 형성이나 조골세포와 활성화된 섬유아세포, 혈관내피세포의 증식 등을 관찰할 수 없었다.

2. 조직계측학적 평가

조직계측학적 관찰 결과 2주에서 자가골 이식부위에서의 신생골 형성이 $12.0 \pm 1.8\%$ 로, $5.0 \pm 2.0\%$ 의 β -TCP 이식부위의 신생골 형성보다 우세하였고, 4주에는 자가골 이식부위에서의 신생골 형성이 $29.0 \pm 6.6\%$ 로 관찰되었고, β -TCP 이식부위의 신생골 형성은 $22.9 \pm 5.6\%$ 로 관찰되어 서로 유의성 있는 차이를 보였다($p < 0.05$). 8주에서는 자가골 이식부위에서 $55.1 \pm 9.6\%$, β -TCP 이식부위에서는 $29.5 \pm 10.0\%$ 의 신생골이 관찰되었고, 12주에서는 자가골 이식부위에서 $74.9 \pm 7.7\%$, β -TCP 이식부위에서는 $43.1 \pm 6.3\%$ 의 신생골이 관찰되어 갈수록 신생골 형성비율에 차이가 커졌다(Table 1).

3. 면역조직화학적 분석

표본에서 BMP2/4/7, PDGF, VEGF, TGF- β 의 발현양상을 다음과 같이 관찰하였다. BMP/2/4/7의 발현은 신생골 주변의 조골세포에서 관찰되었고, PDGF, VEGF,

Table 1. Histomorphometric Analysis

	Autogenous bone			PRP + β -TCP			β -TCP			PRP		
	Graft Bone	New Bone	Soft Tissue	Graft Bone	New Bone	Soft Tissue	Graft Bone	New Bone	Soft Tissue	Graft Bone	New Bone	Soft Tissue
2W	71.3 \pm 5.2	12.0 \pm 1.8	18.7 \pm 2.1	71.8 \pm 13.1	2.7 \pm 0.7	27.1 \pm 8.5	63.9 \pm 9.1	5.0 \pm 2.0	32.6 \pm 3.5	0	0	100
4W	52.9 \pm 5.2	29.0 \pm 6.6	18.1 \pm 3.6	62.4 \pm 10.2	7.0 \pm 2.0	32.3 \pm 7.7	57.4 \pm 8.3	22.9 \pm 5.6	19.8 \pm 4.5	0	0	100
8W	40.8 \pm 9.1	55.1 \pm 9.6	5.2 \pm 0.7	53.1 \pm 7.1	25.2 \pm 4.3	22.8 \pm 4.2	47.9 \pm 6.8	29.5 \pm 1.0	24.2 \pm 5.5	0	0	100
12W	22.3 \pm 4.8	74.9 \pm 7.7	3.1 \pm 0.3	51.1 \pm 14.0	38.6 \pm 6.8	11.1 \pm 3.8	5.2 \pm 3.6	43.1 \pm 6.3	11.5 \pm 2.6	0	0	100

TGF- β_1 의 발현은 신생골 주변의 조골세포와 혈관에서 관찰되었다(Table 2-7).

1) 자가골 이식군

- (1) 2주 : 이식골 주변의 조골세포에서 BMP2는 +, BMP4는 ++정도의 발현이 관찰되었고, BMP7은 +++정도의 발현이 관찰되었다. 조골세포와 혈관에서는 +++정도의 PDGF, VEGF, TGF- β_1 이 발현되었다.
- (2) 4주 : 이식골 주변의 조골세포에서 BMP2/4의 활성

(+/+/+/+)이 2주에서 보다 증가하는 것이 관찰되었으며, 일부의 섬유아세포의 핵에서도 BMP4의 활성이 관찰되었다(Fig. 13, 14). PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 2주와 동일하게 높은 발현이 관찰되었다.

- (3) 8주 : 이식골 주변의 조골세포에서 높은 BMP2/4의 활성이 관찰되었으나, 4주에서 보다는 활성이 전체적으로 떨어지는 것이 관찰되었다. 섬유아세포에서의 활성도는 4주와 별다른 차이가 없었다. BMP2의 발현도 4주에 비해서 다소 감소됨이 관찰되었다. 하지

Table 2. Immunohistochemical Study on BMP-2 Expression

	Autogenous bone				PRP + β -TCP				β -TCP				PRP			
	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12W	2 W	4 W	8W	12 W
Sample 1	++	+++	++	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
Sample 2	+	++	++	+	-	+/-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Sample 3	+/-	++	+	-	-	+/-	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-
Sample 4	+	++	+	-	-	-	+	+/-	-	-	+/-	+	-	-	-	-

Positive was graded on a scale: - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 3. Immunohistochemical Study on BMP-4 Expression

	Autogenous bone				PRP + β -TCP				β -TCP				PRP			
	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12W	2 W	4 W	8W	12 W
Sample 1	+++	+++	++	+/-	+/-	+	++	++	-	-	+	++	-	-	-	-
Sample 2	++	+++	+++	+	-	+	+	++	-	-	+	++	-	-	-	-
Sample 3	++	+++	++	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	++	-	-	-	-
Sample 4	++	++	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	+	+	-	-	-	-

Positive was graded on a scale: - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 4. Immunohistochemical Study on BMP-7 Expression

	Autogenous bone				PRP + β -TCP				β -TCP				PRP			
	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12W	2 W	4 W	8W	12 W
Sample 1	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	++	-	-	-	-
Sample 2	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	++	+++	-	-	-	-
Sample 3	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Sample 4	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	++	++	+++	-	-	-	-

Positive was graded on a scale: - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 5. Immunohistochemical Study on PDGF Expression

	Autogenous bone				PRP + β -TCP				β -TCP				PRP			
	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W
Sample 1	++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	-	-	-	-
Sample 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-	-
Sample 3	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
Sample 4	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	-	-	-

Positive was graded on a scale: - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 6. Immunohistochemical Study on VEGF Expression

	Autogenous bone				PRP + β -TCP				β -TCP				PRP			
	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W
Sample 1	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
Sample 2	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Sample 3	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
Sample 4	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	-	-	-	-

Positive was graded on a scale: - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

Table 7. Immunohistochemical Study on TGF- β_1 Expression

	Autogenous bone				PRP + β -TCP				β -TCP				PRP			
	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W	2 W	4 W	8 W	12 W
Sample 1	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	-	-	-	-
Sample 2	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	-	-	-	-
Sample 3	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-
Sample 4	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	-	-	-	-

Positive was graded on a scale: - representing no staining, +/- indistinct, + weak staining, ++ moderate staining, and +++ strong staining.

만, BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 2, 4 주와 동일하게 높은 발현이 관찰되었다(Fig. 15-18).

- (4) 12주 : 이식골 주변의 조골세포의 수와 BMP 2, 4의 활성이 현저하게 줄어든 양상이 관찰되었다(Fig. 19, 20). 하지만, BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 계속 높게 발현됨이 관찰되었다.

2) β -TCP와 혈소판 농축혈장 이식군

- (1) 2주 : 이식골 주변의 조골세포에서 +/-미만의 BMP2/4가 발현되었다. 조골세포와 혈관에서 +++ 정도의 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현이 자가골 이식군과 비슷하게 발현되었다.
- (2) 4주 : β -TCP 주변과 섬유아세포에서 BMP2/4의 활

성이 미약하게 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 21, 22). 특히, BMP2에서 보다 BMP4에서 약간 더 잘 관찰되었다. 조골세포와 혈관에서 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 2주와 비슷하게 +++ 정도로 높게 발현됨이 관찰되었다.

- (3) 8주 : β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP4의 활성이 증가하는 것이 관찰되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주와 별다른 증가를 보여주지 못하였다. BMP2는 조골세포와 섬유아세포에서 발현이 미약하게 증가함이 관찰되었다. 조골세포와 혈관에서 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 2, 4주와 비슷하게 +++ 정도로 높게 발현됨이 관찰되었다(Fig. 23 - 26).

(4) 12주 : β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP2/4의 발현이 약간 증가하는 양상을 보였다(Fig. 27, 28). 조골세포와 혈관에서 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 전체적으로 +++정도로 높게 발현됨이 관찰되었다.

3) β -TCP 이식군

(1) 2주 : 이식골 주변의 조골세포에서 +/-미만의 BMP2/4가 발현되었다. 조골세포와 혈관에서 +++ 정도의 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현이 자가골 이식군과 비슷하게 발현되었다.

(2) 4주 : β -TCP 주변과 섬유아세포에서의 BMP2/4의 활성의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 29, 30). 조골세포와 혈관에서 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 2주와 비슷하게 +++정도로 높게 발현됨이 관찰되었다.

(3) 8주 : β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP4의 활성이 증가하는 것이 관찰되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주와 별다른 차이를 보여주지 못하였다. BMP2는 조골세포와 섬유아세포에서 발현이 미약하게 증가함이 관찰되었다. 조골세포와 혈관에서 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 2, 4주와 비슷하게 +++정도로 높게 발현됨이 관찰되었다(Fig. 31-34).

(4) 12주 : β -TCP주변의 조골세포에서의 BMP4의 활성이 매우 증가하는 것이 관찰되었고, 섬유아세포에서의 활성은 4주에 비해 별다른 증가를 보여주지 못하였다. BMP2는 조골세포에서 발현이 약간 증가하는 양상을 보였다(Fig. 35, 36). 조골세포와 혈관에서 BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현은 전체적으로 +++정도로 높게 발현이 됨이 관찰되었다.

4) 혈소판 농축혈장 이식군

2주, 4주, 8주, 12주의 실험군과 대조군 모두에서 BMP2/4/7, PDGF, VEGF, TGF- β_1 의 발현을 관찰할 수 없었다.

IV. 총괄 및 고찰

인공치아를 이용한 구강기능의 회복이 대중화되고 있는 상황에서 치조골 회복을 위한 골이식술의 중요성이 대두되고 있다. 자가골, 동종골과 이종골 등이 임상에서 많이 사용되고 있지만 부가적인 수술, 감염 가능성, 전염성 질환의 가능성으로 인해서 사용에 많은 제한을 가지게 된다. 이로 말미암아 생체친화성이 우수한 수산화인회석, 생체유리, 생체도재, 중합체 등의 합성 골대체재들이 개발되고 있다¹⁻⁴⁾. 생

체친화성 골대체재로 β -TCP는 미세기공으로 연결된 생체활성재료로 수산화인회석보다 높은 용해도를 보이며, 다른 calcium phosphate ceramic보다 빠른 흡수를 보이고, 용출, 흡수의 과정을 거쳐 자가골로 치환된다고 보고되고 있다⁴⁻⁵⁾.

Ducheyne 등¹¹⁾은 ceramic이 용해, 침전, 이온변화, 침착, 화학주성, 세포부착과 증식, 세포분화, 세포의 기질 형성이라는 기전을 통해 골로 대체된다고 보고하였다. Lu 등¹²⁾은 TCP의 생체분해가 물리적, 화학적인 용해과정을 거치는 단계와 파골세포와 식세포의 분해과정에 의해서 일어나고, 이식초기에는 주로 물리 화학적인 분해과정이 주를 이루고, 후반기로 갈수록 세포와 관련된 형태의 흡수를 보이면서 골개조 현상이 일어난다고 보고하였다. Merten 등¹³⁾은 동물실험에서 약 20주간의 점진적인 ceramic 흡수가 보이며, 동시에 임프란트를 식립했을 경우 완전한 골유착은 보이지 않았다고 보고하였다. 점진적인 흡수기간 동안 ceramic 분해입자가 골수 안에서 발견되었고, 그것은 동시에 식립된 임프란트의 골유착에 악영향을 끼칠 수 있다고 하였다. 더욱이 식세포들이 많이 집적되어 있으면 역시 골유착에 악영향을 끼칠 수 있다고 주장하였다. 그래서 임프란트는 보통 이식 5내지 6개월 후에 식립되어야 한다고 하였다. Szabo 등¹⁴⁾은 실험에서 순수 β -TCP는 보통 12-18개월 동안 완전히 흡수된다고 하였으며, 기능적인 면이나 해부학적인 면에서 원래 골과 매우 유사한 골로 대체된다고 보고하였다. β -TCP를 이식한 후 6개월이 지난 후에 일부 β -TCP의 과립이 선명하게 관찰되었으며, 과립들은 새롭게 형성된 골에 매입되어 있었고, 다양한 비율로 유골조직이나 연조직이 혼재되어 있었으며 골유형은 대부분 층판골 형태였다고 보고하였다. 이 등¹⁵⁾의 보고에 의하면 가토 두개골에 이식된 β -TCP 주변에 BMP2/4의 발현 양상이나 신생골 생성의 속도는 자가골에 비해 현저하게 지연되는 것을 알 수 있다. 본 실험의 대조군에서 관찰한 결과도 마찬가지로 β -TCP의 신생골 형성 및 BMP2/4등의 발현은 자가골 이식군에 비해 현저하게 지연됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 판단해 볼 때, 인공골대체물질의 골생성을 촉진하는 것이 필요하며, 이러한 골형성 촉진을 위해서 현재 골생성 성장인자나 골아세포 또는 줄기세포들을 골대체물과 혼합하는 시도들이 진행되고 있다¹⁶⁾.

골생성 촉진 인자로 알려진 혈소판 농축혈장이 현재 많이 사용되고 있다. 이 혈소판 농축혈장에 관하여 살펴보면, 혈소판 농축혈장은 혈액으로부터 원심 분리기를 이용하여 혈소판 성분만을 농축시킨 혈장을 의미하며, 이는 정상치의 혈소판 수($150-400 \times 10^3/dl$)보다 혈소판이 풍부하게(약 338%) 농축된 혈장을 말한다⁷⁾. 혈소판 농축혈장의 임상적 적용은 Tayapongsak 등⁶⁾이 하악골 재건시 해면골과 함께 autologous fibrin adhesive (AFA)를 투여하여 방사선 사

진 상 높은 초기골 형성을 최초로 보고한 이후로 혈소판 농축혈장의 골형성 촉진에 관한 관심이 증가하여 현재도 국내외적으로 많은 연구가 진행되고 있는 중이다. Marx⁷⁾도 골 이식술 시 혈소판 농축혈장을 넣어줌으로 초기의 경화와 광물화가 우수하고 방사선학적 평가에서도 골 성숙도가 1.62-2.16배 우수하였으며, 골 구조에서의 밀도가 15-30% 개선되었다고 보고 하였다. 혈소판 농축혈장의 효과에 대해 Vanassche 등¹⁷⁾는 골이식재에 혈소판 농축혈장을 혼합하여 재건한 골조직의 골밀도가 증가된다는 사실을 제시하였다. Gruber 등¹⁸⁾은 혈소판의 성장인자가 골재생과 골절 회복에 국소적인 인자라고 주장하였다. Marx⁷⁾는 5 cm이상의 하악 결손부에서 혈소판 농축혈장 첨가의 긍정적인 효과를 보여 주었다. Aghaloo 등¹⁹⁾과 Jakse 등²⁰⁾은 긍정적인 혈소판 농축혈장의 효과를 확인하는데 실패하였다. Kassolis 등²¹⁾은 상악동 거상술 시 혈소판 농축혈장을 동종건조골과 혼합하여 좋은 결과를 얻었고 조직학적 검사에서도 많은 유골과 이식된 동종건조골 주위로 골 형성을 보여 주었다. 그러나 자신의 실험에서 여러 가지 조건들이 객관성이 없다는 것을 인식하고 확고한 결론을 내리지 않았다. 그는 혈소판 농축혈장이 동종골 이식재의 골형성과 성숙을 강화시키는지 결정하기 위해 많은 실험이 필요함을 언급하였다. 많은 동물실험에서는 실험동물 마다 골형성 시기와 혈소판 농축혈장의 효과가 다름을 보고하고 있다. Furst 등²²⁾은 백서의 하악 결손부와 minipig의 상악동에서, Jakse 등²⁶⁾은 양의 상악동에서, Fennis 등²³⁾은 양의 하악골에서, Suba 등²⁴⁾은 Beagle Dog의 하악 결손부에서, Raghoobar 등²⁵⁾은 환자의 양측 상악동에 실험했을 때 혈소판 농축혈장의 효과에 대해 각각 다른 결과를 보고 했다. Froum 등²⁶⁾은 혈소판 농축혈장과 무기질 골이식재에 혈소판 농축혈장을 혼합하는 것이 생활력 있는 골과 임프란트 주위 계면접촉에 그다지 영향을 주지 않는 것으로 발표하였다. 또한 Furst 등²²⁾은 bovine HA에 혈소판 농축혈장을 혼합하는 것이 HA 단독으로 사용하는 것에 비해 명확한 장점이 없다고 하였다. 이는 혈소판 농축혈장이 치유 능력을 갖춘 세포의 세포분열과 신생혈관생성에 작용한다는 사실에 비추어 당연한 결과라고 생각된다. Raghoobar 등²⁵⁾은 환자의 양측 상악동 거상술 시 자가골과 혈소판 농축혈장을 혼합하여 이식하고 다른 쪽은 자가골을 단독으로 이식하여 3개월 후 생검한 결과 상악동 거상술에 사용된 자가골 이식에 혈소판 농축혈장을 첨가함으로써 골형성에 유의성 있는 증가를 보여 주지 못했고, 임상 결과 또한 임프란트 성공이나 수술 후 부작용에서 어떠한 차이점이 발견되지 않았고 두 군 간에 유의성 있는 골밀도의 차이도 없었다고 보고했다. Fennis 등²³⁾은 골결손이나 방사선 치료를 받은 혈관형성이 느린 환자에서 혈소판 농축혈장이 효과가 있을지 모른다고 주장하였다. 그러나 본 연구 결과 가토의 원형 결손부에 혈소판 농축

혈장을 첨가함으로써 β -TCP를 이용한 골형성에 유의성 있는 증가를 보여주지 못하였다. β -TCP와 혈소판 농축혈장 이식군과 β -TCP 이식군 즉, 혈소판 농축혈장 측과 혈소판 농축혈장을 이용하지 않은 측 간 차이가 없는 것은 아마도 대부분의 골재생이 치유 첫 한 달 내에 이뤄지고, 이것은 혈소판에 있는 성장인자의 활동 양상과 일치한다. 성장인자의 분비, 탈과립화는 3-5일내에 일어나고, 성장인자의 활동은 7-10일 정도면 끝이 난다. 혈소판 농축혈장은 골유도성이 아니고 반드시 살아있는 골세포와 함께 사용되어야 하며, 그렇지 않을 경우 다른 비세포성 이식재료와 골대체물의 현저한 증가는 기대하기 어려울 것이다. Yamada 등¹⁶⁾의 실험에서 선견의 장골 골수에서 얻은 간엽줄기세포를 배양하여 혈소판 농축혈장과 혼합 이식하여 성숙골과 신생혈관이 잘 형성되었음을 보고 하였다. 이 결과를 통해서 조직 공학을 이용한 간엽줄기세포가 혈소판 농축혈장의 효과를 높일 수 있으리라 생각된다.

Urist 등²⁷⁾이 수종의 산으로 탈회한 골기질을 근육과 피하에 이식한 후 이소성 연골이나 골의 분화가 일어난다는 사실을 밝힌 이래 비교원성 단백질인 골형성 유도인자에 대한 연구가 시작되었다. 이러한 이소성 골형성 유도는 태생성 분화가 끝난 태생기 이후에도 미분화 골형성 전구세포를 분화시키는 물질이 존재한다는 것을 의미하며 이후에 이를 골형성단백질(bone morphogenetic protein : BMP)이라 명명했다. Bolander²⁸⁾는 손상받은 골조직의 치유과정을 염증반응과 육아조직을 형성하는 단계, 막내골화 단계, 연골화 단계, 연골내 골화 단계 등의 4단계로 분류하고, 골형성에 관련된 성장인자의 발현은 각 단계별로 다르게 나타난다고 보고했다. 골형성과 골개조 과정에 관련된 BMP 또는 골형성에 관련된 단백질의 발현양상도 이식골의 치유과정에서 여러 단계에 따라서 다르게 나타난다^{29,30)}. 파골세포에 의한 이식골의 흡수는 조골세포의 활성을 증가시켜 BMP의 발현을 활성화시킬 수 있다는 보고가 있다³¹⁾. BMP2/4는 골유도 인자로 미분화간엽세포의 연골분화를 자극하고, 연골성 골형성을 유도한다. BMP2/4는 주로 혈소판이나 혈관내피세포에 집적되어 있다. 여러 가지 BMP 중 BMP2/4는 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나기 때문에 BMP에 의한 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다. BMP7은 BMP2와 함께 OP-1(osteogenic protein-1)이라 불리며 골형성을 유도시키는 능력이 있다고 보고된다. 하지만, Stenport 등³²⁾은 실험에서 작은 골 결손에 rhBMP7을 적용하였지만, 효과적인 골형성은 관찰되지 않았다고 한다. 그러나 본 실험에서는 골이식 시 나타나는 BMP7의 발현은 2, 4, 8, 12주 모두에서 BMP2/4보다 많이 나타났다. BMP에서의 발현이 파골세포와 조골세포의 활성을 완전히 나타내지는 않지만, 골조직이 손상의 치유나 골형성에 관련된다고 보면 이식골 주변의 골형성단백질의

발현은 골형성이 활발하게 일어나는 시기와 파골세포에 의해 이식골의 흡수 또는 분해과정이 일어나는 시기를 결정하는데 중요한 단서가 된다³³⁾. Lee¹⁵⁾ 등은 가토를 이용한 실험에서, 자가골 이식에 있어서는 4주를 기점으로 해서 BMP2/4의 발현이 감소하는 경향을 보고 하였다. 이는 자가골 이식에서 BMP와 관련된 골재생은 4주 이전에 일어난다고 할 수 있다. 반면 β -TCP 이식 후 BMP2/4의 발현은 4-12주로 갈수록 증가하는 것으로 보아 자가골 이식때 보다는 지연되었다. 본 실험에서 BMP2/4는 자가골에서 4주, β -TCP에서 12주에서 ++ 정도의 발현이 관찰되어 신생골 형성과 연관성이 높은 것으로 보였으나, BMP7에서는 자가골, β -TCP, β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합물에서 2, 4, 8, 12주 각각 +++ 정도의 발현도가 나타났다. 이것은 혈소판 농축혈장이 골형성에 여러 가지 방법으로 영향을 준다는 것을 의미한다.

본 실험에서도 BMP2/4/7의 발현 이외에 PDGF, VEGF, TGF- β , 등의 발현을 관찰하였다. PDGF는 상처에서 처음 나타나는 성장인자로 세포분열의 증가, 혈관형성의 발달 유도, 다른 성장인자와 세포들을 활성화한다. 또한 결체조직 치유를 개시한다. 기전으로 PDGF 분자들이 세포막 수용체에 결합하여 고 에너지 인산 결합을 가진 세포내 신호 단백을 활성화 한다. 이 활성화된 신호 단백질은 세포분열, 혈관형성, 대식세포 활성화 등을 유도한다³¹⁾. 본 실험 결과는 PDGF의 발현만을 놓고 보았을 때는 자가골 이식군이나 β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합 이식군, β -TCP 이식군 모두 비슷한 것으로 보여 단순 PDGF의 첨가가 골 형성 촉진에 도움이 된다고 판단하기 어렵다. TGF- β 는 대식세포, 조골세포 등에서 발견되고 합성된다. 혈소판 파괴에 의해 유리되거나 대식세포에 의해 분비되었을 때 전조골세포, 섬유아세포, 골수간세포 등과 같은 부분비성장요소로서 작용한다. 이 표적세포들은 각자의 TGF- β 단백을 합성, 분비하여 인접 세포에 영향을 주는 자가분비 성장인자의 역할을 동시에 한다. 그러므로 TGF- β 는 골형성을 기시할 뿐만 아니라 골이식편의 성숙화를 야기시키는 성장인자의 기전을 대표한다. TGF- β 의 기능은 결합조직 창상치유와 골형성을 위한 교원기질의 침착을 자극하고 조골세포 전구체의 화학주성과 분열형성을 보인다. 골 형성과 골 흡수를 자극하나 흡수보다 형성을 증가시키는 것으로 나타났다³¹⁾. 본 실험 결과 TGF- β 의 발현은 2주, 4주, 8주, 12주에서 자가골 이식군이나 β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합 이식군, β -TCP 이식군 모두 비슷하게 발현되어 TGF- β 의 첨가가 골 형성 촉진에 영향을 준다고 판단하기 어렵다. VEGF는 혈관내피세포에 대하여 강하고 선택적인 분열촉진물질이다. 비록 재생에 있어서 그 역할이 자세히 알려져 있지는 않지만 그 중요성은 체내에서의 혈관형성의 활동성에 통해서 잘 알려져 있다³⁴⁾. 골이식재료의 흡수와 주변의 골형성에 있어서 중요한 요소

인 신생혈관의 생성 또는 속도를 관찰하고자, VEGF의 발현을 실험군과 대조군에서 분석하였다. VEGF는 자가골과 β -TCP 모두에서 높게 발현되는 것으로 볼 때, 이식골 주변의 신생혈관의 생성은 골형성 여부와 관계없이 모든 이식재료에서 일어난다고 판단되며, 혈관의 성장인자에 속하는 PDGF, TGF- β 의 높은 발현은 이러한 신생혈관의 생성에 연관되어짐으로 보이며, 이에 대한 지속적인 연구가 더 필요한 것으로 판단된다. 본 실험에서 실험군과 대조군에서 모두 PDGF, TGF- β , VEGF의 발현이 높게 나타나는 이유는 농축 혈장 속에는 많은 미분화세포와 줄기세포들이 있기 때문에 이식된 후에도 계속하여 발현되는 것으로 생각된다.

PDGF의 합성은 외부자극 즉, 낮은 산소분압, thrombin, 다른 성장인자의 자극 등에 의해 늘어나게 되며 화학주성이며 미분화간엽세포의 활성을 유도한다. PDGF의 국소적 주입은 골형성을 유도하고, 몇몇 동물 모델에서 조골세포에 대한 세포분열효과를 가졌다고 보고하였다. 본 실험에서 PDGF의 발현은 자가골, β -TCP, β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합물에서 2, 4, 8, 12주 각각 +++ 정도의 발현도가 나타났다. 주로 골재생 기간 동안 높게 발현됨을 알 수 있었다. VEGF는 가장 잘 알려진 혈관형성의 유도자로 알려져 있으며, 골의 초기치유에도 도움을 준다고 알려져 있다²⁾. Street 등³⁵⁾은 실험에서 골의 초기치유 과정에서 VEGF의 발현도가 높다고 보고했다. 그러나 본 실험에서는 자가골, β -TCP, β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합물에서 2, 4, 8, 12주 각각 +++ 정도의 발현을 보여 초기치유에서 유의성 있는 관찰을 보이지 않았다. β -TCP, β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합물에서의 PDGF, VEGF, TGF- β 의 발현시기와 신생골 형성시기는 자가골과 비슷하였고, BMP2, 4의 발현이 자가골에 비해 늦어짐이 관찰되었다. 이로보아 β -TCP, β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합물에서의 신생골 형성이 자가골에 비해 늦어지는 이유는 신생혈관 생성의 지연보다는 자가골에 내재된 BMP의 부재 때문인 것으로 사료된다. 향후 β -TCP의 신생골 형성 속도를 촉진시키기 위한 혈소판 농축혈장 이외에 BMP의 복합이식, 자기장 처리, 조직공학 적 골형성 촉진 방법 등에 대한 연구가 계속 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 가토의 두개골 결손부에서 자가골, β -TCP, β -TCP+혈소판 농축혈장, 혈소판 농축혈장을 각각 이식하여, 조직계측학적 방법과 면역조직학적 관찰을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

신생골형성은 2, 4, 8, 12주에 자가골 이식부위에서 $12.0 \pm 1.8\%$, $29.0 \pm 6.6\%$, $55.19 \pm 9.6\%$, $74.9 \pm 7.7\%$

로 나타났고, β -TCP 이식부위에서 $5.0 \pm 2.0\%$, $22.9 \pm 5.6\%$, $29.5 \pm 10.0\%$, $43.1 \pm 6.3\%$ 로 나타났으며, β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합 이식부위에서 $2.7 \pm 0.7\%$, $7.0 \pm 2.0\%$, $25.2 \pm 4.3\%$, $38.7 \pm 6.8\%$ 로 나타나 자가골 이식부위에서만 유의성 있는 차이를 보였다($p < 0.05$). BMP2/4의 발현은 4주의 자가골 이식부위에서, 12주의 β -TCP와 혈소판 농축혈장 혼합 이식부위에서, 12주의 β -TCP 이식부위에서 가장 높게 관찰되었다. BMP7, PDGF, VEGF, TGF- β 의 발현은 자가골 이식, β -TCP 이식, β -TCP+혈소판 농축혈장 혼합이식부위에서 비슷하게 관찰되었다.

결론적으로 혈소판 농축혈장은 β -TCP 이식부위에서의 BMP2/4 발현을 유도하지 않았고 신생골형성도 증가시키지 못하는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Merckx MA, Maltha JC, Stoelinga PJ : Assessment of value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation : a review of clinical reports. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32 : 1, 2003.
2. Laurencin CT : Bone Graft Substitutes, 1st ed. Philadelphia, International Co, 2003, p.180.
3. Bahn S : Plaster: A Bone substitute. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 21 : 672, 1966.
4. Saito M, Shimizu H, Beppu M et al : The role of β -Tricalcium Phosphate in vascularized periosteum. *J Orthop Sci* 5 : 275, 2000.
5. Ogose A, Hotta T, Hatano H et al : Histological examination of β -TCP graft in human femur. *J Biomed Mater Res* 63 : 601, 2002.
6. Tayapongsak PO, Brien DA, Monterio CB et al : Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 52 : 161, 1994.
7. Marx RE : Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85 : 638, 1998.
8. Landesberg R, Roy M, Glickman RS : Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 58 : 297, 2000.
9. Miyazono K, Ten-Dijke P, Ichiyo H et al : Reports for transforming growth factor betar. *Adx Immunol* 55 : 181, 1994.
10. Canalis E, Centrella M, Busch W et al : Insuline like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone culture. *J Clin Invest* 83 : 60, 1989.
11. Ducheyne P, Qiu Q : Bioactive ceramics : The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20 : 2287, 1999.
12. Lu J, Descamps M, Dejou J et al : The Biodegradation Mechanism of Calcium Phosphate Biomaterials in Bone. *J Biomed Mater* 63 : 408, 2002.
13. Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U et al : Intraindividual Comparative Animal Study of α - and β -Tricalcium Phosphate Degradation in Conjunction with

- Simultaneous Insertion of Dental Implants. *J Craniofac Surg* 12 : 59, 2001.
14. Szabo G, Suba Z, Hrabak K et al : Autogenous Bone Versus β -Tricalcium Phosphate Graft Alone for Bilateral Sinus Elevations (2- and 3-Dimensional Computed Tomographic, Histologic, and Histomorphometric Evaluations): Preliminary Results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16 : 681, 2001.
15. Lee SH, Song SI, Hwang KG et al : The experimental study of the bone regeneration on β -TCP in rabbit cranial bone. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 30 : 282, 2004.
16. Yamada Y, Ueda M, Naiki T et al : Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 15 : 589, 2004.
17. Vanassche B, Defranq J : Use of PRP in bone volume augmentation. *Revue Belge de Medicine Dentaire* 56 : 125, 2001.
18. Gruber R, Vargga F, Fischer MB et al : Platelets stimulate proliferation of bone cells : involvement of platelet derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 31 : 529, 2002.
19. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG : Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects : a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60 : 1176, 2002.
20. Jakse N, Tangle S, Gili R et al : Influence of PRP on autologous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res* 14 : 578, 2003.
21. Kassolis J, Rosen PS, Reynolds MA : Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft : case series. *J Periodontol* 71 : 1654, 2000.
22. Furst G, Gruber R, Tangl S et al : Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. *Clin Oral Implants Res* 31 : 529, 2003.
23. Fennis JPM, Stoelinga PJW et al : Mandibular reconstruction : a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 : 281, 2002.
24. Suba Z, Takacs D, Gyulai-Gaal S et al : Facilitation of β -Tricalcium Phosphate-Induced Alveolar Bone Regeneration by platelet-rich plasma in Beagle Dogs: A Histologic and Histomorphometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 6 : 832, 2004.
25. Raghoebar GM, Timmenga NM, Reintsema H et al : Maxillary bone grafting for the insertion of endosseous implants : result after 12-124 months. : *Clin Oral Implants Res* 12 : 279, 2001.
26. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP et al : Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts : three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 22 : 45, 2002.
27. Urist MR, Raskin K, Goltz D et al : Endogenous bone morphogenic protein : immunohistochemical localization in repair of a punch hole in the rabbit s ear. *Plast Reconstr Surg* 99 : 1382, 1997.
28. Bolander MR : Regeneration of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Bio Med* 2000 : 165, 1992.
29. Taylor JC, Cuff SE, Leger JP et al : In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation : A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17 : 321, 2002.
30. Flautre B, Maynou C, Lemaitre J et al : Bone colonization of β -TCP granules incorporated in brushite cements. *J Biomed Mater Res* 63 : 413, 2002.
31. Samuel E, Lynch SE, Robert J et al : Tissue Engineering

- Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. 1st ed. Illinois, Quintessence Publishing Co, 1999, p.73.
32. Stenport VF, Johansson C, Heo SJ et al : Titanium implants and BMP-7 in bone: an experimental model in the rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 14 : 247, 2003.
 33. Trisi P, Rao W, Rebaudi A et al : Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jaw bone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23 : 69, 2003.
 34. Aldecoa EA, Ortiz IA : A new approach to bone regeneration. 1st ed. New York, Puesta Al Dia Publicaciones, 2002, p.88.
 35. Street J, Bao M, de Guzman L et al : Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *PNAS* 99 : 9656, 2002.

저자 연락처

우편번호 133-792

서울 성동구 행당동

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

황 경 균

원고 접수일 2006년 5월 11일

게재 확정일 2006년 8월 29일

Reprint Requests

Kyung-Gyun Hwang

Department of OMFS, College of Medicine, Hanyang University

Hangdang-Dong, Sungdong-Gu, Seoul, 133-792, Korea

Tel: 82-2-2290-8676 Fax: 82-2-2290-8673

E-mail: hkg@hanyang.ac.kr

Paper received 11 May 2006

Paper accepted 29 August 2006

사진부도 ①

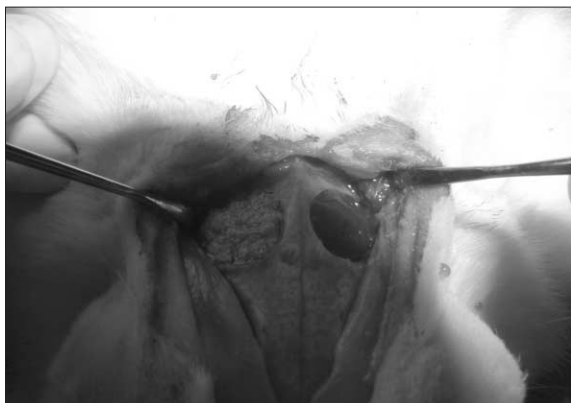


Fig. 1. A(mixture of β -TCP and PRP) and B(PRP) were grafted in rabbit cranial defects(A: Rt. side, B: Lt. side).



Fig. 2. Venous blood was obtained from caudal auricular vein of rabbit.



Fig. 3. The centrifuge for platelet concentration : PLACON®(Oscotec, Korea).



Fig. 4. The blood was spun in centrifuge at 2000G for 3 minutes to separate the plasma containing the platelets from the red blood.

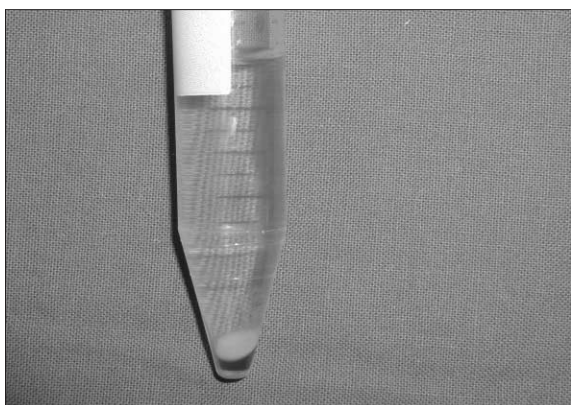


Fig. 5. The plasma containing the platelets was centrifuged at 5000G for 5 minutes.



Fig. 6. β -TCP(tricalcium phosphate).

사진부도 ②

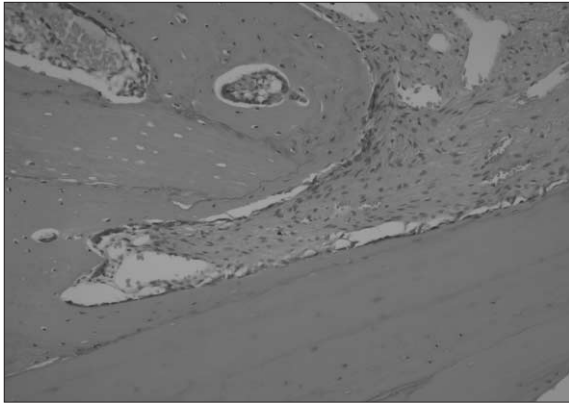


Fig. 7. Microscopic exam. shows the autogenous bone graft, 4 weeks ($\times 200$, H&E).

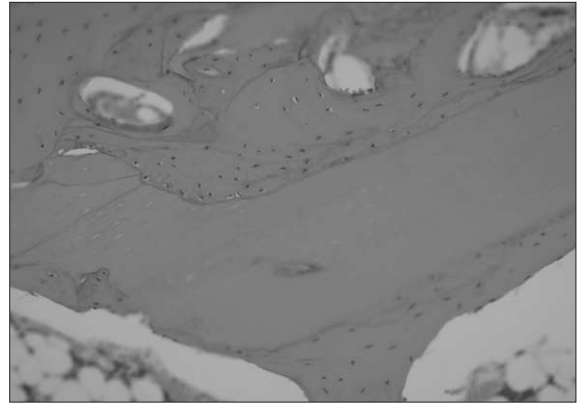


Fig. 8. Microscopic exam. shows the autogenous bone graft, 12 weeks ($\times 200$, H&E).

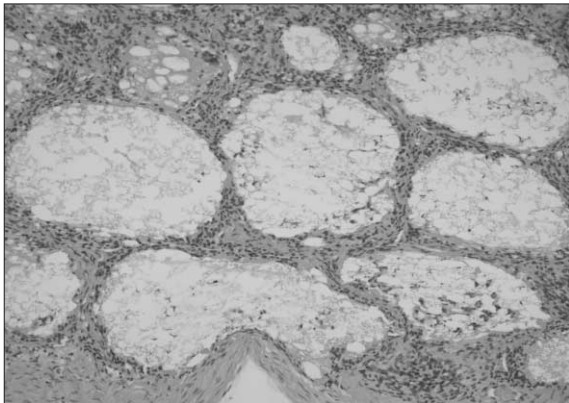


Fig. 9. Microscopic exam. shows the β -TCP with PRP graft, 4 weeks ($\times 200$, H&E).

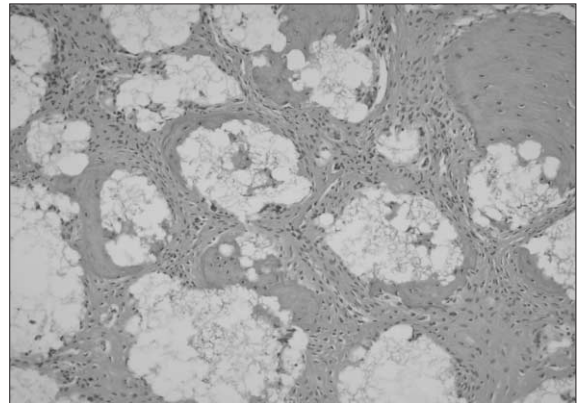


Fig. 10. Microscopic exam. shows the β -TCP with PRP graft, 4 weeks ($\times 200$, H&E).

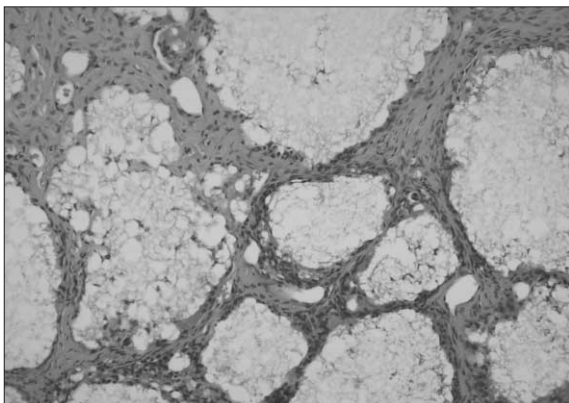


Fig. 11. Microscopic exam. shows the β -TCP graft, 4 weeks ($\times 200$, H&E).

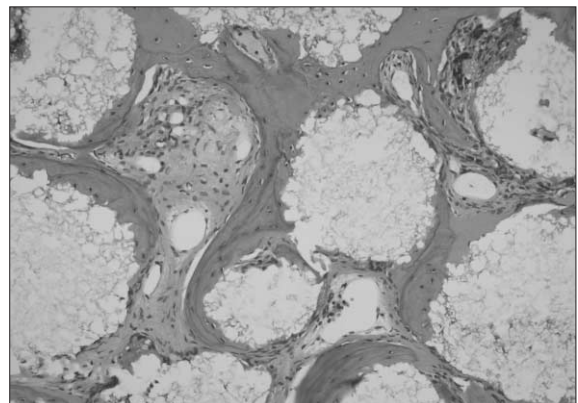


Fig. 12. Microscopic exam. shows the β -TCP graft, 4 weeks ($\times 200$, H&E).

사진부도 ③

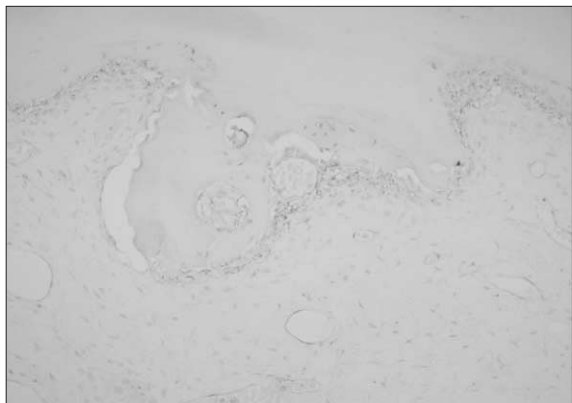


Fig. 13. Immunohistochemical exam. shows BMP-2 expression on the autogenous bone graft, 4 weeks ($\times 200$).

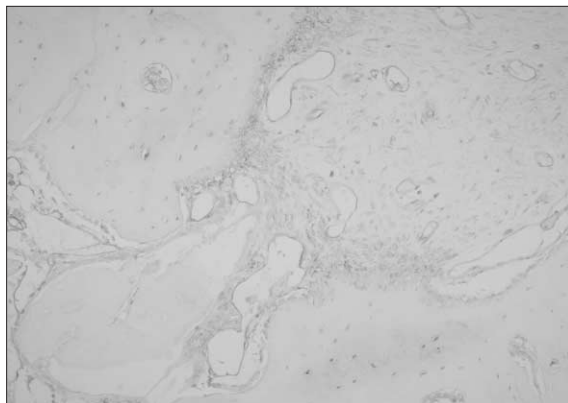


Fig. 14. Immunohistochemical exam. shows BMP-4 expression on the autogenous bone graft, 4 weeks ($\times 200$).

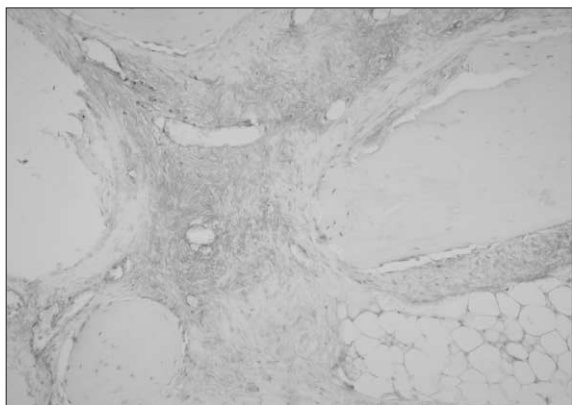


Fig. 15. Immunohistochemical exam. shows BMP-7 expression on the autogenous bone graft, 8 weeks ($\times 200$).



Fig. 16. Immunohistochemical exam. shows PDGF expression on the autogenous bone graft, 8 weeks ($\times 200$).

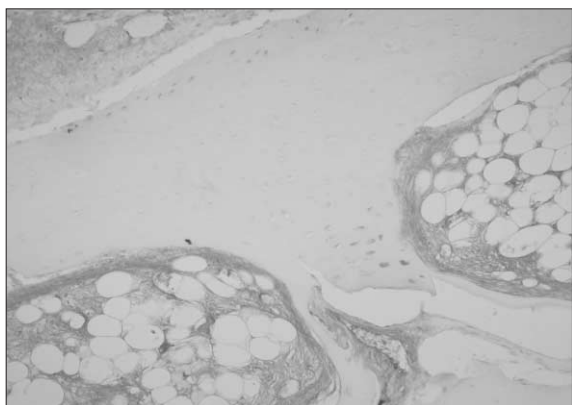


Fig. 17. Immunohistochemical exam. shows VEGF expression on the autogenous bone graft, 8 weeks ($\times 200$).

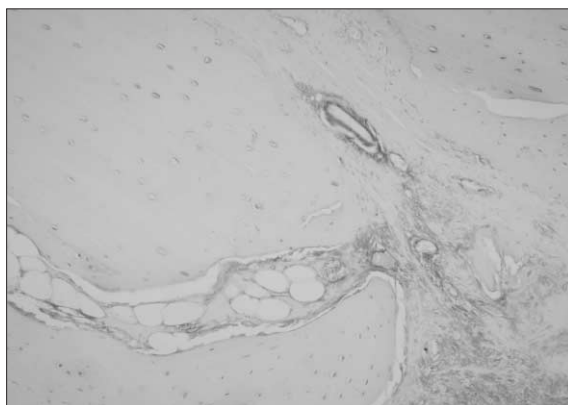


Fig. 18. Immunohistochemical exam. shows TGF- β 1 expression on the autogenous bone graft, 8 weeks ($\times 200$).

사진부도 ④

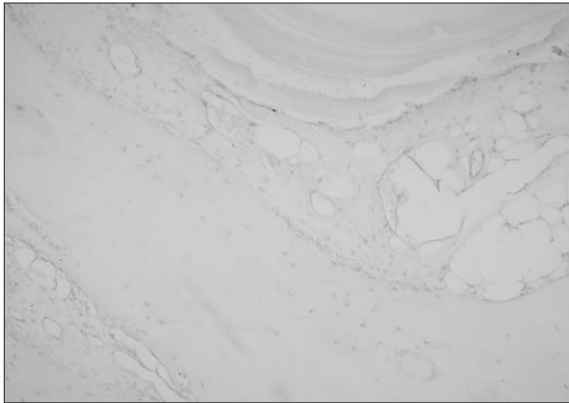


Fig. 19. Immunohistochemical exam. shows BMP-2 expression on the autogenous bone graft, 12 weeks ($\times 200$).

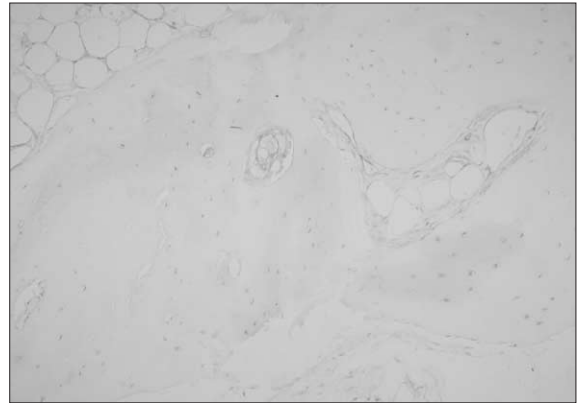


Fig. 20. Immunohistochemical exam. shows BMP-4 expression on the autogenous bone graft, 12 weeks ($\times 200$).

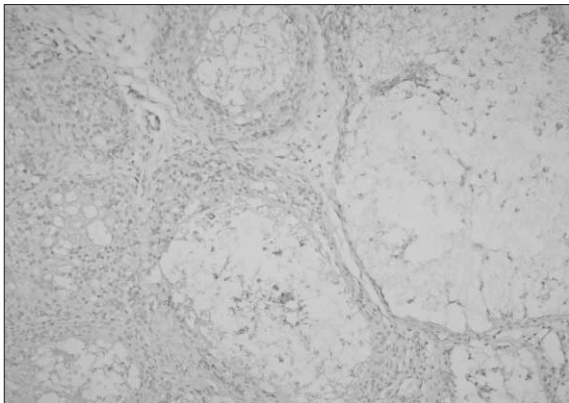


Fig. 21. Immunohistochemical exam. shows BMP-2 expression on the β -TCP with PRP graft, 4 weeks ($\times 200$).

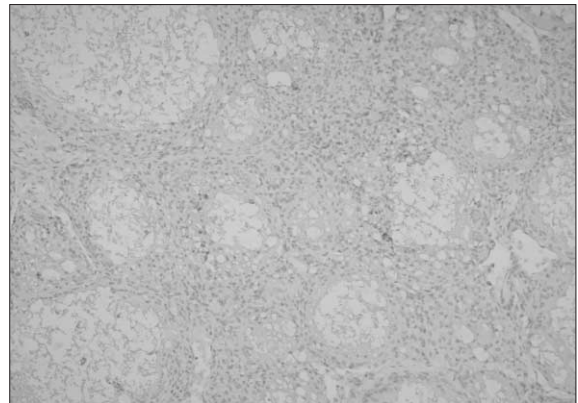


Fig. 22. Immunohistochemical exam. shows BMP-4 expression on the β -TCP with PRP graft, 12 weeks ($\times 200$).

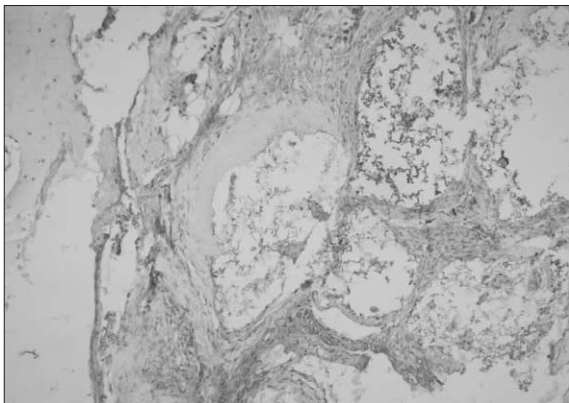


Fig. 23. Immunohistochemical exam. shows BMP-7 expression on the β -TCP with PRP graft, 8 weeks ($\times 200$).

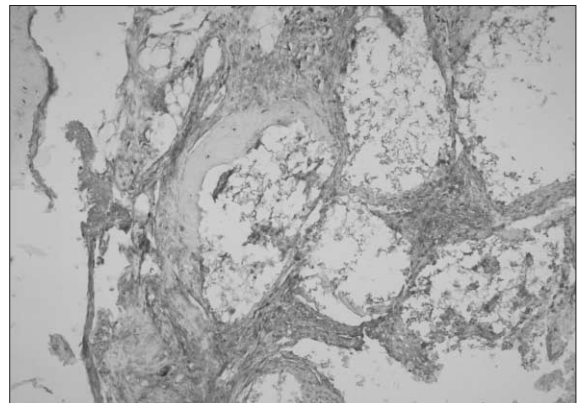


Fig. 24. Immunohistochemical exam. shows PDGF expression on the β -TCP with PRP graft, 8 weeks ($\times 200$).

사진부도 ⑤

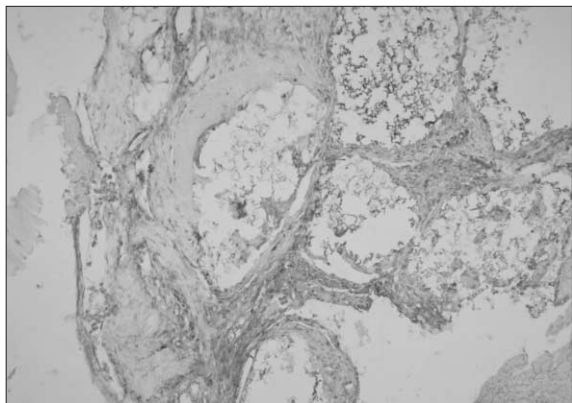


Fig. 25. Immunohistochemical exam. shows VEGF expression on the β -TCP with PRP graft, 8 weeks ($\times 200$).

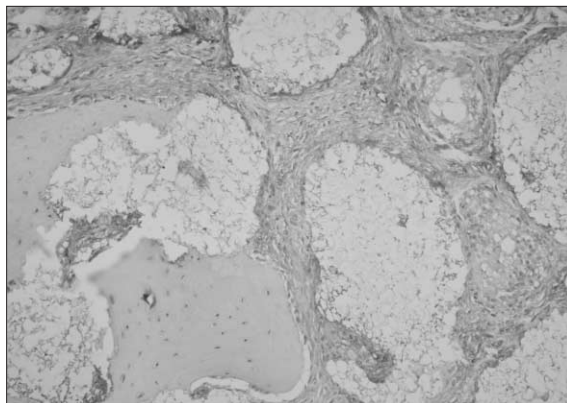


Fig. 26. Immunohistochemical exam. shows TGF- β 1 expression on the β -TCP with PRP graft, 8 weeks ($\times 200$).

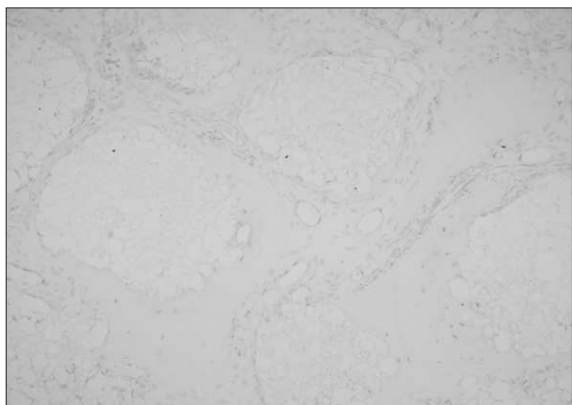


Fig. 27. Immunohistochemical exam. shows BMP-2 expression on the β -TCP with PRP graft, 12 weeks ($\times 200$).

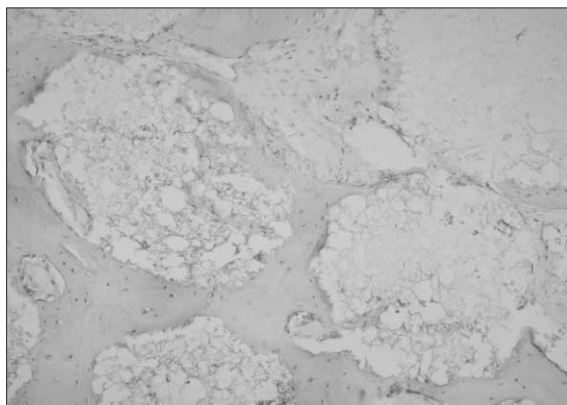


Fig. 28. Immunohistochemical exam. shows BMP-4 expression on the β -TCP with PRP graft, 12 weeks ($\times 200$).

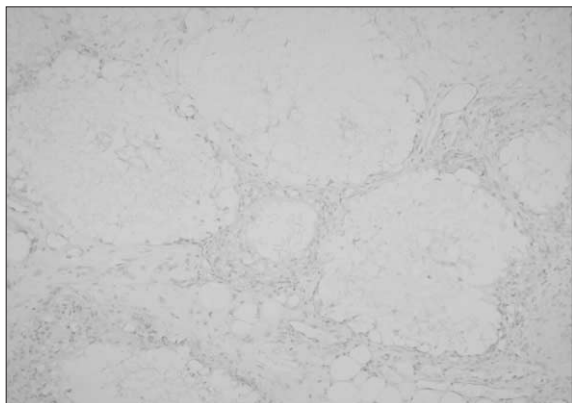


Fig. 29. Immunohistochemical exam. shows BMP-2 expression on the β -TCP graft, 4 weeks ($\times 200$).

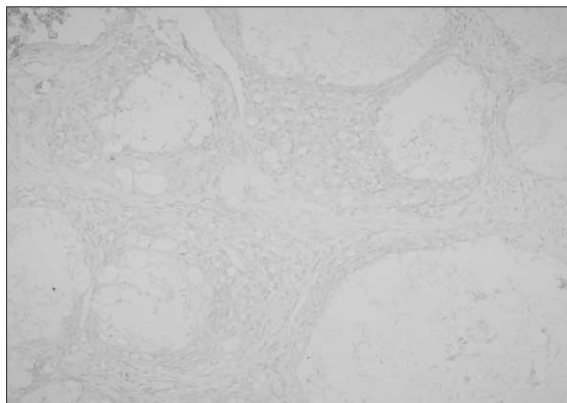


Fig. 30. Immunohistochemical exam. shows BMP-4 expression on the β -TCP graft, 4 weeks ($\times 200$).

사진부도 ⑥

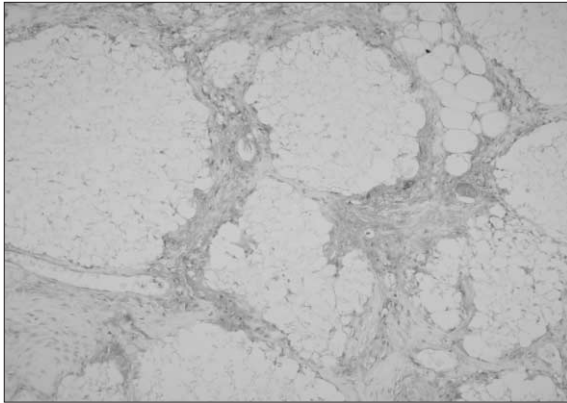


Fig. 31. Immunohistochemical exam. shows BMP-7 expression on the β -TCP graft, 8 weeks ($\times 200$).

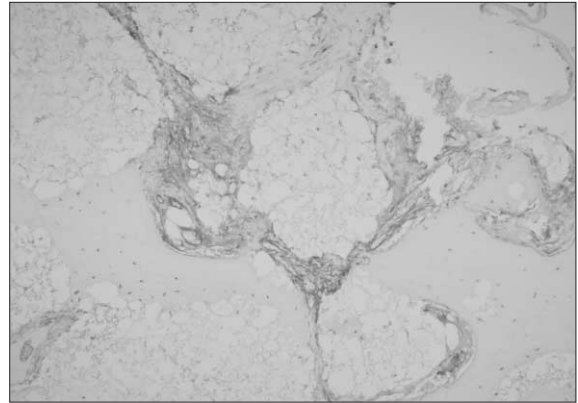


Fig. 32. Immunohistochemical exam. shows PDGF expression on the β -TCP graft, 8 weeks ($\times 200$).

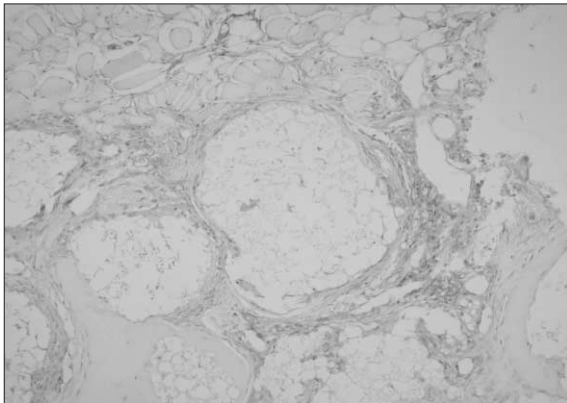


Fig. 33. Immunohistochemical exam. shows VEGF expression on the β -TCP graft, 8 weeks ($\times 200$).

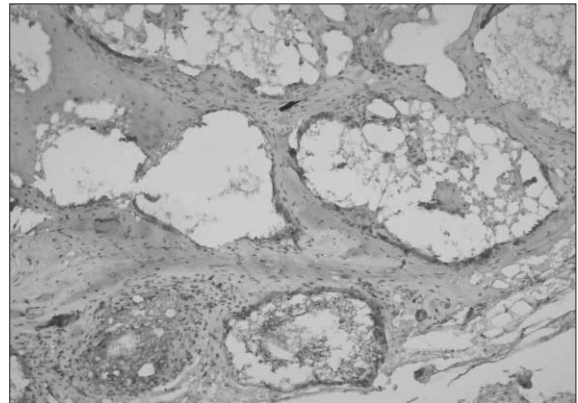


Fig. 34. Immunohistochemical exam. shows TGF- β 1 expression on the β -TCP graft, 8 weeks ($\times 200$).



Fig. 35. Immunohistochemical exam. shows BMP-2 expression on the β -TCP graft, 12 weeks ($\times 200$).

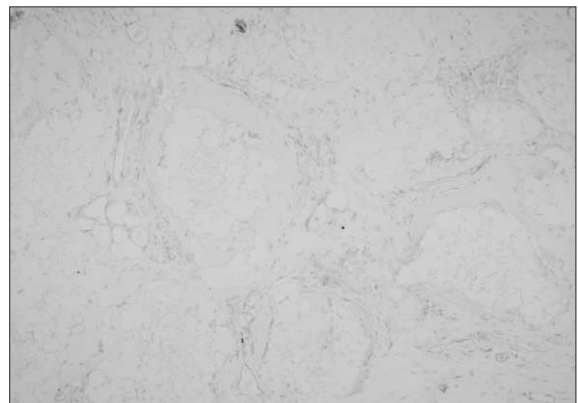


Fig. 36. Immunohistochemical exam. shows BMP-4 expression on the β -TCP graft, 12 weeks ($\times 200$).