

백서에서 혈소판 풍부 혈장의 제작과 유효성에 대한 실험적 연구

이상훈¹ · 조영욱² · 지현숙² · 안강민¹ · 이부규¹¹울산대학교 의과대학, 서울아산병원 구강악안면외과학교실, ²울산대학교 의과대학, 서울아산병원 진단검사의학과교실

Abstract

FABRICATION OF PLATELET-RICH PLASMA IN A RAT MODEL
AND THE EFFICACY TEST *IN VITRO*Sang-Hoon Lee¹, Young-Uk Cho², Hyun-Sook Chi², Kang-Min Ahn¹, Bu-Kyu Lee¹¹*Department of Oral and Maxillofacial Surgery and* ²*Clinical Pathology,*
Asan Medical Center, Medical College of Ulsan University

Purpose: Platelet-rich plasma (PRP) is known to accelerate and/or enhance hard and soft tissue healing and regeneration. As such, PRP has been used in various clinical fields of surgery. Recently there have been several attempts to use PRP in the field of tissue engineering. However, some controversies still exist on exact mechanism and benefits of PRP. Therefore various animal experiments are necessary to reveal the effect of the PRP. However, even if animal experiment is performed, the efficacy of the experiment could not be validated due to absence of an animal PRP model. The purpose of this study is to establish rat PRP model by comparing several PRP fabricating methods, and to assay growth factor concentration in the PRP.

Materials and methods: Rat blood samples were collected from nine SD rat (body weight: 600-800g). PRP was prepared using three different PRP fabricating methods according to previously reported literatures. (Method 1: 800 rpm, 15 minute, single centrifuge; Method 2: 1000 rpm, 10 minute, double centrifuge; Method 3: 3000 rpm, 4min and 2500 rpm, 8 min, double centrifuge). Platelet counts were evaluated in an automated machine before and after PRP fabrications. In terms of growth factor assay, prepared PRP were activated with 100 unit thrombin and 10% calcium chloride. Growth factor (PDGF-BB, VEGF) concentrations on incubation time were determined by sandwich-ELISA technique.

Results: An average of 3ml (via infraorbital venous plexus) to 15ml (via celiac axis) the rat blood could be collected. By using Method 3 (3000 rpm, 4 min and 2500 rpm, 8 min, double centrifugation), around 1.5ml of PRP could be prepared. This method allowed us to concentrate platelet 3.77-fold on average. PDGF-BB concentration (mean, 1942.10 pg/ml after 1 hour incubation) and VEGF concentration (mean, 952.71 pg/ml after 1 hour incubation) in activated PRP were higher than those in untreated blood. Also PDGF-BB showed constant concentration during 4-hour incubation, while VEGF concentration was decreased after 1 hour.

Conclusion: Total 11,000 g minute separation and condensation double centrifuge method can produce efficient platelet-rich plasma. Platelet-rich plasma activated with thrombin has showed higher concentrations of growth factors such as PDGF-BB and VEGF, compared to the control group. Platelet-rich plasma model in a rat model was confirmed in this study.

Key words: Tissue engineering, Platelet-rich plasma, Growth factor

※ 이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2006-E00328).

I. 서 론

혈소판 풍부 혈장은 1997년 Whitman 등¹⁾에 의해 구강 악안면외과 영역에 처음으로 소개된 뒤, 연조직 및 경조직의 치유 및 재생을 촉진하는 것으로 보고되면서 점차 다양한 외과 영역으로 그 범위를 넓혀가고 있으며²⁻⁴⁾, 최근에는 혈소판 풍부 혈장을 성장인자의 전달체 또는 성장인자를 함유한 비계(scaffold)로서 조직공학에 사용하기 위한 여러 가지 시도가 이루어지고 있다. 하지만 혈소판 풍부 혈장이 실제로 조직의 치유 및 재생을 촉진시키는가에 관해서는 논란이 계속되고 있는데, 일례로 골조직의 치유에 대한 효과에 관하여는, 골형성과 성숙속도가 크게 개선되었다고하는 주장⁴⁻⁶⁾이 있는 반면 다른 학자들은 대조군과 큰 차이를 보이지 않는다고 주장하였다⁷⁻⁹⁾. 이러한 논란은 여러 가지 원인에 기인하지만 그 핵심은 골이식재와 함께 사용된 혈소판 풍부 혈장이 과연 유효한 것인가에 관한 것이었다.

연조직과 경조직을 포함한 조직의 치유는 아직 완전히 이해되지 못한 여러 가지 신호물질에 의해 조정 받는 세포내외 활동의 복잡한 조합에 의해 이루어진다. 혈소판은 조직 손상에 반응하여 혈병을 만들고 활성화되면서 여러 가지 성장인자를 분비하게 된다. 혈소판에서 분비되는 것으로 알려진 성장인자는 Platelet-derived growth factor(PDGF), Transforming growth factor- β (TGF- β), Vascular endothelial growth factor(VEGF), Epidermal growth factor(EGF), Insulin-like growth factor(IGF) 등이다^{10,11)}.

혈소판 풍부 혈장은 이러한 혈소판을 통상 3~7배 고농도로 농축한 것으로^{4,12)} 고농도의 성장인자 방출을 통해 조직의 치유에 기여하는 것으로 알려져 있다. 혈소판은 내부의 α 입자가 파괴되면서 성장인자를 방출하게 되는데, 혈소판 풍부 혈장에서는 이러한 혈소판 활성화를 일으키기 위해 트롬빈을 사용한다.

트롬빈은 성장인자 방출을 일으키는 강력한 혈소판 활성화제로 알려져 있다^{13,14)}. 또한 혈소판 풍부 혈장이 칼슘 및 트롬빈과 혼합되면 골이식재와 함께 사용할 때 조작성을 높여줄 수도 있다. 일반적으로 트롬빈은 임상에서는 80~200 unit의 농도로 사용되지만⁴⁾, 혈소판의 최대 응축이 일어나는 농도는 0.5~4 unit 정도로 알려져 있다¹³⁾. 하지만 실험동물에서 제작된 혈소판 풍부혈장에서 적절한 응고가 일어나 골이식재와 함께 사용되어 적절한 조작성을 제공하면서 성장인자를 가장 효율적으로 방출시키는데 필요한 트롬빈의 농도에 관해서는 아직 연구된 바 없다.

본 실험의 목적은 실험 동물에서 혈소판 풍부 혈장 모델을 확립하여, 혈소판 풍부 혈장의 임상적 적용에 대한 정확한 기전과 효과를 밝히고, 혈소판 풍부 혈장을 이용한 다양한 동물실험 결과의 정당성을 입증하는데 기반이 되는 자료를

구축하는데 있다. 본 연구에서는 백서 모델을 이용하여, 다양한 조건에서 혈소판 풍부 혈장을 제작하고 이를 비교하여 효율적인 혈소판 풍부 혈장 제작 방법을 확립하고, 칼슘과 트롬빈으로 혈소판이 활성화된 후의 성장인자 방출 변화를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 연구방법

1. 실험동물

몸무게 600-800g의 수컷인 20주령 백서(Sprague-Dawley Rat) 9마리를 본 연구에서 이용하였다. 실험실 환경에 순응시키기 위해 첫 1주일간 표준화된 조건에서 지냈으며, pelleted standard rodent diet (No.1320, Altromin)와 tap water를 제한없이 섭취하였다. 모든 시술과정과 시술기구를 포함한 시술영역은 무균적인 환경이었다. 채혈은 에테르를 이용하여 전신 마취 후 복강동맥에서 시행하거나(Fig. 1), 마취없이 안와하정맥총을 통해 시행하였다(Fig. 2).

2. 혈소판 농축 혈장의 제작

전신마취 상태에서 개복 후 복강 동맥을 18 게이지 바늘로 천자하여 15ml 채혈하였으며, 채혈된 혈액은 2ml ACD-A(Anticoagulant citrate dextrose solution formula A, Fenwal, MA, USA)가 담긴 용기에 보관하였다.

채혈된 혈액은 원심분리가 이루어지기 전, 자동화된 기기(Sysmex SE-9000)를 이용하여 일반혈액검사를 시행하였고, 원심분리 후 제작된 혈소판 농축 혈장 역시 일반혈액검사를 시행하였다.

항응고처리된 혈액은 각각 다음의 방법을 이용하여 혈소판 농축 혈장을 제작하였다. 각 제작방법은 문헌고찰을 통해 이미 보고된 방법 중에서 선택하였으며 각 방법의 효율성을 비교하였다.

방법 1: 800 rpm, 15분으로 원심분리 후 육안으로 혈구와 혈장층을 분리¹⁵⁾

방법 2: 140g (1000 rpm), 10분으로 1회 원심분리 후 육안으로 혈구와 혈장층을 확인하고 이를 분리한 후, 분리한 혈장층을 다시 140g (1000rpm), 10분 원심 분리하여 혈소판 풍부 혈장을 분리¹⁶⁾

방법 3: 1000g(3000rpm), 4분으로 1회 원심 분리하여 혈구와 혈장층을 확인하고 이를 분리한 후, 분리한 혈장층을 다시 800g(2500rpm), 8분 원심 분리하여 혈소판 풍부 혈장층과 혈소판 부족 혈장층 분리¹⁷⁾

이상의 3가지 방법으로 얻어진 혈소판 농축 혈장은 전혈 (whole blood) 상태에서 측정된 혈소판의 수보다 3~7배 증가된 경우에만 혈소판 풍부 혈장으로 인정하고, 이 경우에만 성장인자의 정량적 분석을 시행하였다.

방법 1과 방법 2는 각각 2마리의 백서를 이용하여 혈소판 풍부 혈장을 제작한 후 각각의 혈소판 수를 측정하였고, 방법 3은 4마리의 백서를 이용하여 제작한 후 혈소판 수를 측정하였다. 방법 3으로 혈소판 풍부 혈장을 제작할 때 총 1.5ml의 혈소판 풍부 혈장을 얻기 위해 혈소판 부족 혈장을 첨가하여 농축액을 희석하였다.

3. 트롬빈과 칼슘을 이용한 혈소판의 활성화

준비된 혈소판 풍부 혈장은 혈소판 활성화를 위해 트롬빈 (트롬빈 동결건조 분말 5000단위, 이연제약) 및 칼슘 (Calcium chloride, Sigma Co., St. Louis, USA)과 혼합되었다. 트롬빈 75 unit, 10% 칼슘 혼합액 100 μ l을 혈소판 풍부 혈장 150 μ l에 첨가하여 혈소판을 활성화시켰다.

4. 성장인자의 정량적 분석

혈소판 풍부 혈장에 트롬빈과 칼슘을 혼합한 균을 실험군으로 하고, 아무런 처리도 가하지 않은 백서의 혈액균을 대조군으로 하여 방출된 성장인자의 농도를 분석하였다. 분석을 위한 시료는 다음의 2군이였다.

시료 A(대조군): Blood (500 μ l)

시료 B(실험군): PRP (150 μ l) + thrombin 100 unit + 10% calcium (100 μ l)

단, 시료 B에 사용된 혈소판 풍부 혈장은 방법 3에 의해 제작된 것을 사용하였다. 각각의 시료는 트롬빈과 칼슘을

혼합한 직후를 기준으로 각 0시간, 1시간, 2시간, 4시간 멸균된 37 $^{\circ}$ C 세포배양기 내에서 배양하였고, 배양 후에는 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

방출된 성장인자를 정량적으로 분석하기 위해서 ELISA를 시행하였다. PDGF-BB와 VEGF를 분석하기 위해 Quantikine ELISA kit (RRV00, MBB00, R&D systems, Minnesota, USA)를 이용하였다. PDGF-BB와 VEGF의 정량분석은 제조사의 지시에 따라 다음과 같이 시행하였다.

냉동된 시료는 상온에서 약 30분간 해동하고, 해동이 끝나면 부드럽게 흔들어 균일한 용액이 되게 하였다. 혈액과 혈액에 트롬빈을 첨가한 시료는 각각 500 μ l와 600 μ l이었고, 이를 3000rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈장을 얻고, 혈장 70 μ l와 kit에 포함된 Calibrator Diluent RD6-3(VEGF의 경우는 RD5-3) 70 μ l를 혼합하여 2배로 희석하였다. 혈소판 풍부 혈장과 혈소판 풍부 혈장에 트롬빈이 첨가된 시료는 각각 150 μ l와 250 μ l였으며, serum 70 μ l와 Calibrator Diluent RD6-3(VEGF의 경우는 RD5-3) 70 μ l를 혼합하여 2배로 희석하였다. Kit에 포함된 성장인자 표준용액을 희석하여 표준용액(2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.25pg/ml)을 준비하였으며, 1ml의 증류수를 대조군으로 준비하였다. 각각의 well에 Assay Diluent RD1X(VEGF의 경우는 RD1-41) 50 μ l와 시료, 표준용액, 대조군 50 μ l씩을 분주하였다. 각 well은 wash buffer를 이용하여 흡입, 세척하였고, 흡입, 세척은 5번 반복하였다. 100 μ l의 PDGF-BB conjugate(VEGF의 경우는 VEGF conjugate)를 분주하고 2시간 배양한 뒤, 흡입, 세척을 5번 반복하였다. 100 μ l의 substrate를 분주한 뒤, 빛을 차단하고 30분간 배양하였다.



Fig. 1. Blood sampling via celiac axis.



Fig. 2. Blood sampling via infraorbital venous plexus.

Table 1. Complete Blood Count of SD Rat

	WBC (10 ⁸ /ml)	RBC (10 ⁸ /ml)	Hb (g/dl)	HCT (%)	Platelet (10 ⁸ /ml)
Rat a	5.78	7.25	12.1	36.2	3.36
Rat b	5.51	8.18	13.6	40.8	5.18
Rat c	7.01	7.50	12.5	38.3	5.92
Rat d	5.53	7.57	12.2	37.6	4.96

(WBC: white blood cell, RBC : red blood cell, Hb : hemoglobin, HCT : hematocrit)

5. 활성화된 혈소판 풍부 혈장의 물성 분석

500μl의 혈소판 풍부 혈장을 2개의 dish에 각각 18 개이지 주사침을 이용하여 분주하고, 분주된 혈소판 풍부 혈장에 4 unit와 100 unit의 트롬빈, 칼슘 혼합액을 첨가하였다. 혼합 후 즉시, 10분, 60분 주기로 18 개이지 주사침을 찔러서 혈소판 풍부 혈장의 응고 정도를 측정하였다. 혼합 후 60분에는 dish를 45° 각도로 기울여 응고되지 않고 남아있는 혈장이 있는지를 측정하였다.

III. 연구 결과

1. 백서에서의 채혈

백서에서 혈액을 얻는 방법은 여러가지가 있으나 실험동물을 희생시키지 않고 혈액을 얻기 위해서는 안와하정맥총을 이용하는 것이 가장 효과적이었다. 하지만 이때 얻을 수 있는 혈액은 제한적이어서 약 3~5ml의 혈액을 얻을 수 있었다. 실험동물을 희생하면서 혈액을 얻는 경우에는 최대한의 혈액을 얻기 위해서 에테르를 이용한 전신마취하에 복강동맥을 노출시키고 채혈하는 것이 가장 효과적이었다. 이 경우 약 10~15ml의 혈액을 얻을 수 있었다.

2. 혈소판 풍부 혈장의 제작

1) 원심분리 방법에 따른 혈소판 풍부 혈장의 제작

문헌에 나타난 여러 제작 방법 중 세가지를 선택하여 혈소판 풍부 혈장을 제작하였다(Table 1). 이 중 방법 1과 방법 2는 최초 혈소판 보다 각각 1.41±0.52배, 1.70±0.37배로 혈소판이 농축되었다. 이는 혈소판 풍부 혈장이 최초 혈소판보다 3~7배 농축되어야 한다고 보았을 때 유효한 혈소판 풍부 혈장이라고 볼 수 없었다. 방법 3은 Marx가 제시한 제작 원칙¹⁷⁾에 따른 방법으로 제작된 혈장 농축액의 혈소판 수치를 측정한 결과(Table 2), 기존의 혈소판에 비해 약 3.7±0.74배로 혈소판이 농축되어(Table 3) 세가지 방법 중 유일하게 기준에 맞는 유효한 혈소판 농축 혈장을 제

Table 2. Complete Blood Count of Fabricated Platelet-rich Plasma

	WBC (10 ⁸ /ml)	RBC (10 ⁸ /ml)	Platelet (10 ⁸ /ml)
Rat a	0.28	0.02	10.18
Rat b	0.29	0.02	19.55
Rat c	0.07	0.04	23.97
Rat d	0.28	0.03	13.10

(WBC: white blood cell, RBC : red blood cell)

작할 수 있었다.

2) 혈소판 풍부 혈장의 제작 효율

4마리의 백서에서 각각 10~15ml의 혈액을 채취하였고, 이를 방법 3을 이용하여 유효한 혈소판 풍부 혈장을 제작하였다(Table 4). 제작할 수 있는 혈소판 풍부 혈장의 양은 목표하는 혈소판 농축 정도에 따라 조절이 가능하였다. 이것은 목표하는 혈소판 농축 정도보다 더 많이 농축된 혈소판 풍부 혈장을 얻은 경우, 분리된 혈소판 부족 혈장을 혈소판 풍부 혈장과 섞어 희석시키면, 혈소판 농축 정도를 떨어뜨리게 되어 목표한 혈소판 농축 정도를 얻으면서 전체 혈소판 풍부 혈장의 양은 약간 늘릴 수 있었다. 본 실험에서는 상기 방법을 이용하여 4마리 백서의 혈소판 풍부 혈장의 양을 1.5ml로 통일하였다. 만약 혈소판 풍부 혈장의 혈소판 농축 정도를 4배 정도로 통일하여 제작한다면 개체에 따라서 각기 다른 양의 혈소판 농축액을 얻을 수 있지만 본 실험에서는 동일한 양의 혈소판 풍부 혈장에서의 성장인자 농도를 측정하기 위하여 모든 개체의 혈소판 풍부 혈장의 양을 1.5ml로 통일하였다.

3) 혈소판 풍부 혈장의 활성화와 물성 변화

제작된 혈소판 풍부 혈장은 트롬빈과 칼슘을 혼합하면 차츰 응고되어 겔상태로 변화하였다. 이러한 응고는 10분내에 이루어졌으며 (Fig. 3, 4), 응고된 후에는 하나의 덩어리로 뭉치기가 용이하였다. 500μl의 혈소판 풍부 혈장을 응고시

Table 3. Mean Platelet Concentration and Yield

	Platelet concentration WB (10 ⁸ platelets/ml)	Platelet concentration PRP (10 ⁸ platelets/ml)	Platelet Yield (fold)
Method 1	3.57±0.87	5.05±1.96	1.41±0.52
Method 2	4.08±0.63	6.95±2.04	1.70±0.37
Method 3	4.85±0.78	18.29±5.97	3.77±0.74

(WB : whole blood, PRP : platelet-rich plasma)

Table 4. Volume of Fabricated Platelet-Rich Plasma and Platelet-Poor Plasma

	Original blood volume (ml)	Fabricated PPP volume (ml)	Fabricated PRP Volume (ml)
Rat a	8.0	3.0	1.5
Rat b	12.5	3.5	1.5
Rat c	14.5	3.7	1.5
Rat d	13.8	2.8	1.5

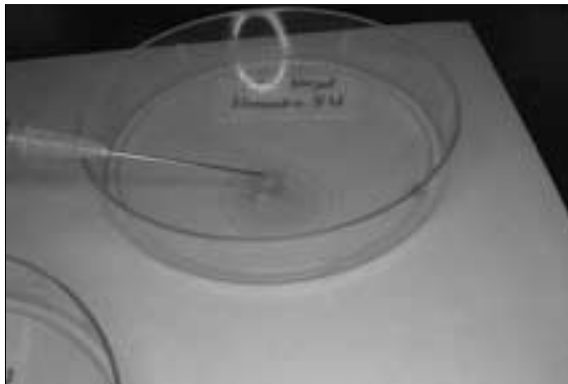


Fig. 3. Platelet-rich plasma activated with 5 units thrombin after 10 minute activation.



Fig. 4. Platelet-rich plasma activated with 100 units thrombin after 10 minute activation.



Fig. 5. Platelet-rich plasma activated with 100 units thrombin after 60 minute activation.



Fig. 6. Platelet-rich plasma activated with 5 units thrombin after 60 minute activation.

Table 5. Comparison of Mean Growth Factor Concentration in Platelet-rich Plasma Activated with 100 unit Thrombin

	0 hour (pg/ml)	1 hour (pg/ml)	2 hour (pg/ml)	4 hour (pg/ml)
PDGF-BB	1941.9±516.7	1896.7±400.3	1719±440.6	1849±506.5
VEGF	524.0±714.9	952.71±884.2	251.67±386.1	14.7±20.4

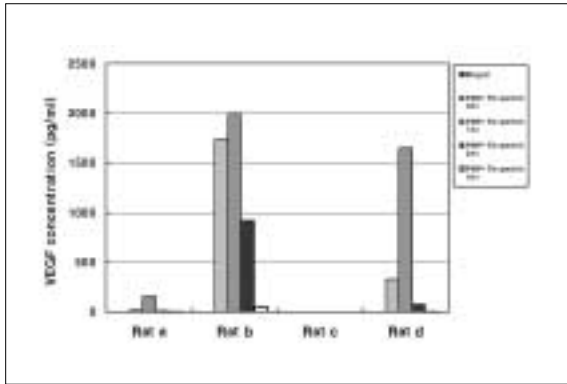


Fig. 7. VEGF concentration in blood and activated PRP.

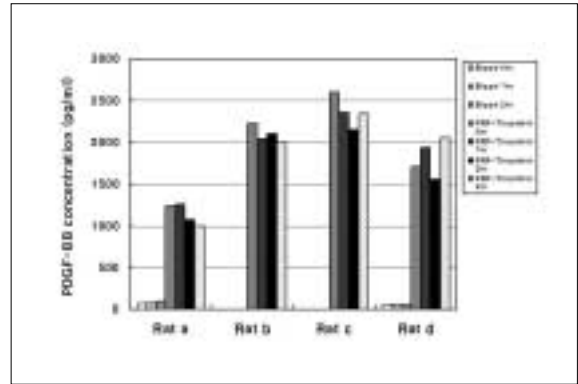


Fig. 8. PDGF concentration in blood and activated PRP.

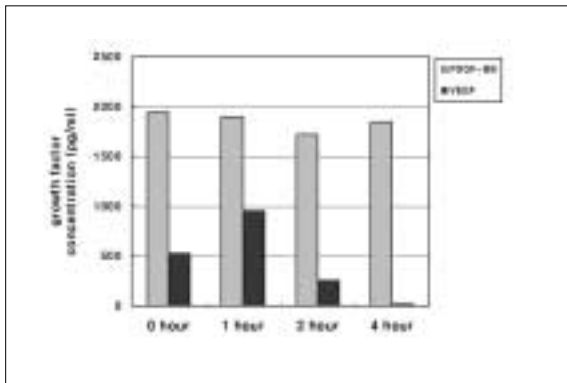


Fig. 9. Comparison of mean growth factor concentration in platelet-rich plasma activated with 100 unit thrombin.

백서 혈액의 VEGF 농도는 배양시간에 관계없이 일반 분석이 불가능할 정도로 아주 낮은 농도가 나왔지만, 트롬빈으로 활성화시킨 혈소판 풍부 혈장의 경우 배양 1시간 후에는 평균 952.71 pg/ml의 VEGF가 검출되었다. VEGF는 혈소판이 활성화된 직후부터 배양 1시간까지 증가하다가 배양 2시간부터는 급격히 감소하여 배양 4시간에는 아주 소량(14.71pg/ml)만이 검출되었다(Fig. 7). 백서 혈액의 PDGF 농도는 배양 직후 49.1 pg/ml로 검출되어 배양 시간에 따라 큰 변화가 없었다. 트롬빈에 의해 활성화된 혈소판 풍부 혈장은 이보다 약 39±7.81배 많은 1941.9 pg/ml가 검출되었다(Fig. 8). 이러한 농도는 VEGF와 달리 배양 시간에 따라 큰 차이는 없이 배양 4시간까지 유지되는 것을 관찰하였다(Table 5, Fig. 9).

IV. 고 찰

키기 위해서는 100U의 트롬빈이 필요하였다. 60분간 100U의 트롬빈과 반응시킨 500μl 혈소판 풍부 혈장의 경우 전체가 응고되었지만(Fig. 5), 5U의 트롬빈을 사용한 경우 일부는 응고되지 못하고 액체처럼 흘러내렸다(Fig. 6).

3. 성장인자의 정량적 분석

트롬빈과 칼슘으로 혈소판을 활성화시킨 시료에서 PDGF-BB와 VEGF의 농도가 혈액에 비해 높게 나타났다.

혈소판 풍부 혈장은 혈소판의 활성화와 집적을 통해 피브린 응괴를 형성하면서 지혈작용을 하게 된다. 피브린 응괴는 칼슘과 트롬빈에 의해 피브리노겐이 피브린으로 합성되면서 형성된다¹⁸⁾. 이러한 피브린 응괴는 지혈뿐 아니라 조직을 형성하는데 필요한 세포의 이주를 가능하게 하는 비계의 역할도 하게 된다^{19,20)}.

혈소판 풍부 혈장의 상처 치유에 관한 효과는 여러 문헌에서 보고 되고 있지만, 사용된 혈소판 풍부 혈장이 과연 유효

한 것인가에 대해서는 아직도 여러 가지 논란이 있을 수 있다. Marx²¹⁾에 따르면 유효한 혈소판 풍부 혈장을 얻기 위해서는 FDA에 의해 승인된 완전 자동화된 기계를 사용하거나, 자동화된 기계를 사용하지 않을 경우, 혈소판의 농축 정도 확인, 정확한 혈구 분리, 첨가되는 트롬빈의 농도와 양 등 여러 가지 조건을 충족하는 매우 세심한 제작 과정이 필요하다고 하였다. 혈소판 풍부 혈장이 효과가 없다고 주장하는^{7,22,23)} 대부분의 보고를 살펴보면 사용된 혈소판 풍부 혈장의 유효성에 대해서 별다른 언급이 없어 그것이 과연 혈소판 풍부 혈장인가에 대한 의문이 제기되고 있다²¹⁾. 또한 동물을 대상으로 한 실험에서는 아직 실험 동물에서 제작된 혈소판 풍부 혈장이 과연 유효인가에 대한 고찰이 없기 때문에 그러한 주장은 더욱 설득력을 가진다. 최근 혈소판 풍부 혈장을 조직공학에 응용하고자 하는 시도에서도 실험동물에서 제작된 혈소판 풍부 혈장의 유효성이 확립되지 않는 한 그 결과를 신뢰하기는 힘들다. 실험동물에서 효과적인 혈소판 풍부 혈장의 제작법을 확립하고 그 유효성을 확립하는 것이 향후 진행될 연구의 타당성을 확보하기 위한 필수적인 단계이다. 본 실험에서는 문헌에 소개된 3가지의 혈소판 풍부 혈장 제작방법을 사용하였다. 그러나 3가지 방법 중 2가지, 즉 800 rpm, 15분으로 원심분리 후 육안으로 혈구와 혈장층을 분리하는 방법¹⁵⁾과 140g (1000 rpm), 10분으로 1회 원심분리 후 육안으로 혈구와 혈장층을 확인하고 이를 분리한 후, 분리한 혈장층을 다시 140g (1000rpm), 10분 원심 분리하여 혈소판 풍부 혈장을 분리하는 방법¹⁶⁾은 유효한 농도로 혈소판을 농축시킬 수 없었다. Marx는 혈소판 풍부 혈장의 요건으로 혈소판이 일반혈액보다 3~7배 농축되어야 한다고 밝히고 있고,^{4,12,17)} 이 정도 농축된 혈소판 풍부 혈장에서만이 성장인자의 방출 농도가 충분히 증가한다고 알려져 있다^{24,25)}.

Marx는 효과적으로 혈소판을 농축시키기 위해 2번의 분리 과정을 제안하였다¹⁷⁾. 이 과정은 4분간 약 1,000g (3,000rpm)의 분리 회전과 8~9분간 800g(2500rpm)의 농축 회전을 포함하는 과정으로 전체 회전이 11,000g minute가 되어야 한다. 이것은 혈소판의 막을 파괴할 수 있는 힘(30,000g minute)의 약 1/3에 해당되는 힘이다. 이를 기준으로 볼 때 앞의 두 방법은 전체 회전이 각각 1,120g minute와 2,800g minute로 Marx제안한 힘의 1/3과 1/10 밖에는 해당되지 않는다. 사람과 백서와의 차이를 고려한다고 해도 이는 매우 큰 차이이다. 이러한 두 방법을 이용하여 백서에서 혈소판 풍부 혈장을 제작하였다고 기술한 문헌에서도 혈소판이 3~5배 정도 농축되었다고 하였으나, 본 실험에서는 그와 같은 농도의 농축 혈장을 얻을 수는 없었다. 이는 술자의 기술이나 혈액의 양이 다르기 때문이라고 볼 수도 있지만 백서에서 얻을 수 있는 혈액의 양이 매우 제한적임을 고려할 때, 2가지 방법이 반복적으로

유효한 혈소판 풍부 혈장을 얻기 위한 방법으로는 부적절하다고 판단된다. 본 실험에서는 Marx가 제안한 방법3을 통하여 반복적으로 충분히 농축된 혈소판 혈장을 얻을 수 있었다. 실험 개체에 따라 최소 3배에서 최대 6배까지 농축된 혈장을 얻을 수 있었는데, 목표하는 혈장 농축도를 4배 정도로 설정하고 혈소판 부족 혈장을 혈소판 풍부 혈장에 혼합하여 희석시켜서 좀 더 많은 양의 농축 혈장액을 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 목표하는 혈소판 풍부 혈장을 1.5ml로 설정하고 그에 따라 혈소판 부족 혈장을 희석하였고, 평균 3.77 ± 0.74 배의 혈소판이 농축된 혈소판 풍부 혈장을 얻을 수 있었다. 목표로 하는 농도치의 더 많은 양의 혈소판 풍부 혈장을 얻기 위해서는 더 많은 양의 혈액이 필요하다. 이것은 백서의 경우 실험개체를 희생할 때만 얻을 수 있는데, 따라서 백서에서 실험개체를 희생시키지 않으면서 자가 혈소판 풍부 혈장을 제작하고 그 후 추가적인 후속실험을 하기 위해서는, 백서의 안와하정맥총을 통해 약 3~5ml 정도의 혈액을 채취하여 약 150 μ ~500 μ 정도의 혈소판 풍부 혈장을 얻어 실험하는 경우만이 가능하다.

트롬빈은 혈소판을 응집시키고 성장인자를 방출시키는 유도제로 알려져 있다¹³⁾. 그러나 혈소판을 최대로 응집시킨다고 알려진 트롬빈의 농도와 임상에 사용된 농도는 큰 차이가 있다(4 unit/ml versus 140 unit/ml)^{4,14)}. 본 연구에서는 4 unit/ml의 트롬빈과 75 unit/ml의 트롬빈을 각각 500 μ 의 혈소판 풍부 혈장과 혼합한 후 시간에 따른 응고 정도를 조사하였다. 혈소판 풍부 혈장의 응고는 상처 치유 초기 상처부위의 응고를 가속화시켜 상처 치유를 촉진시키고,²⁶⁾ 골이식재와 혼합시 조작성을 높여주므로 임상적으로 중요한 의미를 가진다. 트롬빈 혼합 직후 2개의 실험군 모두에서 혈소판 풍부 혈장의 응고가 진행되었지만 60분이 지났을 때는 75 unit/ml의 트롬빈을 사용한 혈소판 풍부 혈장만이 모두 응고되어 골이식재와 혼합하여 사용할 때 더 나은 조작성을 보일 것으로 기대할 수 있었다.

상처치유과정에서 혈소판 풍부 혈장의 효과는 혈소판 풍부 혈장에 혈액보다 높게 함유된 혈소판의 수에 기인한다. 혈소판이 활성화되면서 방출되는 여러 가지 성장인자와 분화요소는 상처치유를 조절하고 촉진하는데 필수적인 요소이며, 세포분열, 세포주성, 세포분화나 대사에 중요한 역할을 한다²⁷⁾. 혈소판은 α 입자와 dense body, 리소좀 등 다양한 입자를 가지고 있는 것으로 알려지고 있다^{28,29)}. 정상적인 상처 치유과정에서 혈소판은 활성화되고 α 입자가 파괴되면서 그 내용물이 방출된다. 혈소판의 α 입자에는 상처 치유에 중요한 세포 분화능과 화학주성을 가진 성장인자가 들어있는데, 혈소판에서 방출되는 것으로 알려진 주요한 성장인자는 PDGF, TGF- β , VEGF, EGF, IGF 등이다^{10,30,31)}. 따라서 혈소판 풍부 혈장에 함유된 고농도의 성장인자 방출이 연조직의 치유나 경조직의 치유를 가속화시키거나 증진시

킨다²⁶⁾. 몇 개의 성장인자를 단독 또는 병용하여 상처에 적용시키는 것보다 혈소판 풍부 혈장을 사용하는 것은 비교할 수 없는 장점을 가진다. 그것은 혈소판 풍부 혈장에 여러 가지 성장인자가 고농도로 함유되어 있고, 다양한 성장인자는 서로 상호 작용을 하여 아직까지 완전히 이해되지 못한 여러 경로를 통해서 상처 치유를 촉진할 수 있기 때문이다. 또한 자가 혈액을 이용하여 제작되기 때문에 그 효과와 안정성에 있어서도 동종 또는 재조합된 성장인자보다 높다.

본 실험에서는 혈액과 활성화된 혈소판 풍부 혈장에 있는 PDGF-BB와 VEGF의 농도를 측정하였다. PDGF는 상처 치유의 초기 단계부터 발현되기 시작하여 상처치유 과정 내내 필수적인 것으로 알려져 있고, VEGF는 상처치유의 증식기부터 발현되어 혈관신생에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이 두 가지 성장인자의 시간에 따른 방출 농도를 측정하는 것은 혈소판 풍부 혈장이 정상적인 상처 치유를 어떻게 가속화하는지를 밝히는데 도움이 된다.

가장 광범위하게 연구된 성장인자인 PDGF는 상처에서 단핵구, 중성구, 섬유아세포, 골아세포 등에 화학주성을 가지며, 섬유아세포, 근육세포 분화를 촉진하고 상처 치유 단계 중 혈관생성, 섬유세포 형성, 재상피화에 기여하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 또한 PDGF는 IGF와 TGF- β 와 함께 골격계 치유 과정을 조절하는 중추적 역할을 담당한다^{32,33)}. 산소가 희박한 상태에서 PDGF-BB는 VEGF mRNA의 발현을 유도하여, 신생혈관 재생을 촉진하여 상처를 치유하는데 기여하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 본 실험에서 PDGF-BB의 농도는 활성화된 혈소판 풍부 혈장에서 일반 혈액보다 39배 정도 증가되었다. 이러한 결과는 인간의 혈소판 풍부 혈장을 연구한 Lacoste 등²⁵⁾과 Weibrich 등³⁵⁾의 연구결과와 일치한다. 이러한 검출량은 혈소판이 활성화된 직후부터 배양 4시간까지 꾸준히 유지되며 VEGF에 비해 개체간의 차이도 작았다. 이런 특징은 PDGF가 혈소판 풍부 혈장이 상처 치유의 전 단계에 걸쳐 효과를 발현할 수 있음을 보여준다.

VEGF는 혈관재생을 촉진하여 만성상처의 치유를 촉진하고 골내 골화를 돕는 것으로 알려져 있다^{36,37)}. 특히 VEGF는 아주 적은 농도에서 세포분화를 촉진시키고, 고농도(0.5 μ g into rat segmental defect)에서는 골형성을 방해하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 인간의 혈소판 풍부 혈장의 경우, Banks 등³⁹⁾은 트롬빈과 칼슘으로 활성화시킬 경우 많은 양의 VEGF가 검출되는 것으로 보고하였다. 그러나 VEGF의 검출량은 실험개체에 따라 변이가 크고 혈소판의 농축도와 그 검출량은 무관하여 다른 성장인자와는 다른 발현 기전이 있을 것으로 유추할 수 있다³⁵⁾. 본 실험에서도 개체간에 검출되는 농도 차이가 매우 컸으며, PDGF보다 저농도로 검출되며, 시간에 따른 검출농도에도 차이를 보였다. PDGF가 배양 4시간에 걸쳐 꾸준히 고농도로 유지되는데

반해 VEGF는 혈소판 활성화 직후부터 배양 1시간까지 증가하다가 배양 2시간부터는 감소하여 배양 4시간째에는 거의 검출되지 않았다. 일반적인 상처치유 과정에서 약 2주부터 VEGF가 발현되는 것을 고려해 볼 때 이것은 특이한 점으로 혈소판 풍부 혈장이 초기에 상처치유를 촉진시킨다는 주장의 근거가 될 수 있다.

혈소판 풍부 혈장에서는 혈액보다 높은 농도의 성장인자가 방출되지만 혈소판 풍부 혈장을 만드는 농축 기술 자체가 상당한 양의 성장인자 방출을 직접 유도하지는 못한다^{35,39-43)}. 이러한 사실은 혈소판을 농축한다고 하더라도 성장인자를 함유하고 있는 혈소판 입자 파괴의 척도인 P-selectin의 발현을 증가시키지 못한다고 보고한 Ekback 등⁴⁴⁾의 연구결과에 의해 뒷받침된다. 따라서 혈소판 풍부 혈장에서 높은 농도의 성장인자가 방출되는 것은 농축된 혈소판이 충분한 농도의 트롬빈에 의해 활성화되어 나타나는 결과이다.

인간의 혈소판 풍부 혈장에 다양한 농도의 트롬빈을 사용했을 때 성장인자의 방출에 미치는 영향은 몇 가지 논문에서 언급되었다^{24,25)}. 사람의 혈소판 풍부 혈장을 대상으로 Frechette 등²⁴⁾은 트롬빈의 농도 변화가 몇몇 성장인자의 방출에 다른 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 그들의 실험에 따르면 EGF 농도는 임상적 사용 농도인 120 units에서 최대를 보이는 반면 II-1 β 는 그 절반인 60 units에서 최대 방출을 보이고, Ang-2는 4 units의 트롬빈 농도에서 최대 방출이 일어난다고 한다. 또한 EGF와 Ang-2는 배양 6시간째에 최대 성장인자 방출이 일어나지만 II-1 β 는 그보다 훨씬 낮은 3일째에 최대 방출이 일어난다고 하였다. 이러한 결과는 성장인자에 따라 서로 다른 방출기전과 시기가 존재한다는 것을 의미하며, 실험 동물에서도 이와 유사한 결과가 나타나는지는 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 백서의 혈소판 풍부 혈장 제작을 위해서는 몸무게가 많은 개체가 유리하며, 최대 약 15ml의 혈액을 얻을 수 있다.
2. 총 11,000g minute의 분리회전과 농축회전을 이용해 혈소판 풍부 혈장을 제작하는 것이 보고된 다른 방법에 비해 반복적이면서 유효한 혈소판 풍부 혈장을 얻을 수 있다.
3. 약 15ml의 혈액을 이용해 약 1.5 ml의 혈소판 풍부 혈장을 얻을 수 있으며, 이 양은 개체에 따라 유동적이다.
4. 트롬빈과 칼슘을 이용해 혈소판을 활성화시키면 더 높은 농도의 성장인자 방출을 기대할 수 있다. 단, 성장인자에

따라 그 방출량, 방출시기와 방출지속시간에는 차이가 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 백서에서 유효한 혈소판 풍부 혈장의 제작이 가능하며, 백서모형을 이용한 다양한 PRP연구가 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Whitman DH, Berry RL, Green DM : Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 55 : 1294, 1997.
- Bhan JC : Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 18 : 27, 2002.
- Margolis DJ, Kantor J, Santanna J et al : Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24 : 483, 2001.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM et al : Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85 : 638, 1998.
- Kim SG, Chung CH, Kim YK et al : Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17 : 86, 2002.
- Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA : 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.
- 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.
- Froom 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.
- Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ : Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma : case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21 : 345, 2001.
- Kevy SV, Jacobson MS : Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol* 36 : 28, 2004.
- Slater M, Patava J, Kingham K et al : Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 13 : 655, 1995.
- Marx RE : Platelet-rich plasma (PRP) : what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 10 : 225, 2001.
- Macfarlane DE, Walsh PN, Mills DC et al : The role of thrombin in ADP-induced platelet aggregation and release : a critical evaluation. *Br J Haematol* 30 : 457, 1975.
- Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR et al : In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 275 : H1054, 1998.
- Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ et al : The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res* 17 : 305, 2006.
- Ogino Y, Ayukawa Y, Tsukiyama Y et al : The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100 : 302, 2005.
- Marx RE, Garg AK : Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. Chicago : Quintessence : 2005, p.35.
- Martinowitz U, Spotnitz WD : Fibrin tissue adhesives. *Thromb Haemost* 78 : 661, 1997.
- Davies JE : Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11 : 391, 1998.
- Lin PH, Kirko MK, von Fraunhofer JA et al : Wound healing and inflammatory response to biomaterials. In : Chu CC, von Fraunhofer JA, editors. *Wound Healing closure and Device* : CRC Press : 1997, p.7.
- Marx RE. Platelet-rich plasma : evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62 : 489, 2004.
- Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G et al : Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 63 : 370, 2005.
- Jakse N, Tangl S, Gilli R et al : Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res* 14 : 578, 2003.
- Frechette JP, Martineau I, Gagnon G : Platelet-rich plasma : growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 84 : 434, 2005.
- Lacoste E, Martineau I, Gagnon G : Platelet concentrates : effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol* 74 : 1498, 2003.
- Sanchez AR, Eckert SE, Sheridan PJ et al : Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20 : 526, 2005.
- Wong ME, Hollinger JO, Pinerio GJ : Integrated processes responsible for soft tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82 : 475, 1996.
- Harrison P, Cramer EM : Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 7 : 52, 1993.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R : Activated platelets release two types of membrane vesicles : microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94 : 3791, 1999.
- Hosgood G : Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Vet Surg* 22 : 490, 1993.
- Spencer EM, Tokunaga A, Hunt TK : Insulin-like growth factor binding protein-3 is present in the alpha-granules of platelets. *Endocrinology* 132 : 996, 1993.
- Mohan S, Baylink DJ : Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 263 : 30, 1991.
- Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI : Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 289 : 292, 1993.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA : Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110 : 139, 2002.
- Weibrich G, Kleis WK, Hafner G : Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 30 : 97, 2002.
- Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM et al : Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg* 90 : 133, 2003.
- Maes C, Carmeliet P, Moermans K et al : Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 111 : 61, 2002.

38. Harten RD, Svach DJ : Vascular endothelial growth factor inhibits DBM induced bone formation. Paper presented at : 49th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society; February 4; New orleans, 2003.
39. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE et al : Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets : significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 77 : 956, 1998.
40. Hulshof MC, Sminia P, Barten-Van Rijbroek AD et al : Prognostic value of plasma transforming growth factor-beta in patients with glioblastoma multiforme. *Oncol Rep* 8 : 1107, 2001.
41. Neben K, Moehler T, Egerer G et al : High plasma basic fibroblast growth factor concentration is associated with response to thalidomide in progressive multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 7 : 2675, 2001.
42. Sasaki T, Maita E : Increased bFGF level in the serum of patients with phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 25 : 42, 1998.
43. Zimering MB : Effect of intravenous bisphosphonates on release of basic fibroblast growth factor in serum of patients with cancer-associated hypercalcemia. *Life Sci* 70 : 1947, 2002.
44. Ekback G, Edlund B, Smolowicz A et al : The effects of platelet apheresis in total hip replacement surgery on platelet activation. *Acta Anaesthesiol Scand* 46 : 68, 2002.

저자 연락처

우편번호 138-736
서울 송파구 풍납2동 388-1
울산대학교 의과대학 서울아산병원 구강악안면외과
이 부 규

원고 접수일 2007년 1월 20일
게재 확정일 2007년 3월 14일

Reprint Requests

Bu-Kyu Lee
Dept. of OMFS, Asan Medical Center, Medical College of Ulsan Univ.
388-1, Pungnap 2 dong, Sonpa-gu, Seoul, 138-736, Korea
Tel: 82-2-3010-5970 Fax: 82-2-3010-6967
E-mail: bukyu67@yahoo.co.kr

Paper received 20 January 2007
Paper accepted 14 March 2007