

## 혈액은행의 혈소판농축액을 이용한 당뇨생쥐의 창상치유

한승규<sup>1</sup> · 정성호<sup>1</sup> · 이병일<sup>1</sup> · 김우경<sup>1</sup> · Finn Gottrup<sup>2</sup>

고려대학교 의과대학 성형외과학교실<sup>1</sup>, University of Southern Denmark<sup>2</sup>

### Treatment of Diabetic Mouse Wounds using Blood Bank Platelet Concentrates

Seung-Kyu Han, M.D.<sup>1</sup>, Seong Ho Jeong, M.D.<sup>1</sup>,  
Byung Il Lee, M.D.<sup>1</sup>, Woo Kyung Kim, M.D.<sup>1</sup>,  
Finn Gottrup, M.D., D.M.Sc.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plastic Surgery, Korea University College of Medicine, <sup>2</sup>The University Center of Wound Healing, Odense University Hospital

**Purpose:** Many clinical trials have shown the effectiveness of platelet releasate on chronic wounds. However, a large volume of blood must be aspirated from a patient and a platelet separator is required. Here, we hypothesized that platelet concentrate obtained from a blood bank (PCBB) would be also effective at stimulating wound healing. The purpose of this study was to investigate the effectiveness of PCBB on accelerating healing of diabetic wounds *in vivo*.

**Methods:** Round wounds of 5 mm diameter were made at four sites(two wounds on the left and two on the right side) on the backs of nine diabetic mice. Three hundred million platelets suspended in 0.05 ml fibrinogen were dispersed on each wound on left sides. Same amount of fibrinogen without platelets was dispersed on right side control wounds. Thereafter, 0.05 ml thrombin was applied to the each wound. Ten days after wound treatment, healed wounds were excised and the extent of wound healing in each group was compared.

**Results:** Quantitative histologic analysis of epithelial gap distances revealed that PCBB treatment had greatly accelerated wound healing. Mean epithelial gap distances for PCBB treated and control wounds were  $2.5 \times 0.6$  mm and  $3.6 \times 0.5$  mm, respectively( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Our results suggest that PCBB has potential to accelerate the healing of diabetic wounds.

**Key Words:** Blood bank platelet concentrate, Diabetic wound

Received September 4, 2006

Revised January 9, 2006

**Address Correspondence:** Seung-Kyu Han, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Korea University Guro Hospital, 97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea. Tel: 02) 2626-3333 / Fax: 02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

### 1. 서 론

당뇨성 족부궤양과 같은 만성 난치성 창상은 변연절제술이나 소독 처치 같은 일반적인 창상치유만으로는 좋은 결과를 보이지 않는 경우가 흔하다. 이는 정상적인 창상치유 과정의 이상으로 인한 것으로, 성장인자를 포함한 세포분비 물질의 양적, 질적 감소가 그 핵심적인 요인으로 주목되고 있다. 따라서 세포분비 물질의 공급을 근간으로 하는 다양한 방법이 시도되고 있다. 성장인자를 환부에 국소도포하거나, 냉동 보관된 각질세포 및 섬유아세포가 포함된 동종피부를 이식하는 방법이 소개되었으나 효능을 입증하지는 못하였다. 최근에는 기존의 치료가 냉동 보관된 세포를 활용하여 효과가 없었다는 이론적 배경 하에, 신선한 섬유아세포를 사용하여 향상된 치료성적을 보고하기도 하였다.<sup>1</sup>

혈소판은 창상의 응고기부터 치유 과정에 관여하여 PDGF, IGF-1, EGF, FGF 등 다양한 성장인자를 분비하여 창상치유를 유도하고 조율하는 중추적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 최근 이 같은 혈소판을 자가 혈액으로부터 채취하여 혈소판 분비물이나 혈소판 겔(Platelet gel) 형태로 만성 창상에 사용하여 효능을 입증하였다는 여러 보고가 있었다.<sup>2,7</sup> 하지만 전신질환을 앓고 있는 환자로부터 다량의 혈액을 채취하여 창상치유를 위한 혈소판 농축액을 추출하는 과정은 환자에게 해로울 수도 있을 뿐만 아니라, 경제적인 부담 요인이 발생한다는 점도 간과해서는 안될 것이다. 저자들은 이 같은 문제점을 극복하고자 혈액은행에 보관된 혈소판 농축액(Platelet Concentrate obtained from a Blood Bank: 이하 PCBB)도 창상치유를 촉진할 수 있다는 가설 하에 이전 연구에서 PCBB의 혈소판유래성장인자 분비능을 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과 혈소판 농축액은 제조 후 11일까지 혈소판유래성장인자를 분비하였으며, 트롬빈을 첨가할 경우 5일까지 분비 기간이 연장되는 것으로 밝혀졌다.<sup>8</sup> 이는 자가 혈소판 농축액과 비교할 때 PCBB도 효능상 유사한 것으로 동물 실험을 통해 창상치유의 효능을 확인할 수 있을 것으로 기대되었다. 이에 저자들은 본 연구를 통해 당뇨생쥐의 창상

에 PCBB를 사용하여 그 효능을 검증하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 실험대상

유전적으로 조작하여 당뇨형질을 가진 수컷의 검은 생쥐 (BKS.Cg-m+/+Leprdb; Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea) 총 9마리를 대상으로 하였다. 연령은 생후 8-10주였으며, 몸무게는 40-45 gm이었다. 생쥐는 개별 우리에 각각 보호된 상태로 본 연구자들이 속해있는 기관의 동물실험실에서 사육되었다.

### 나. 실험방법

먼저 실험 전 24시간 이내에 채취 및 제조된 신선한 혈액은행의 혈소판 농축액을 준비하였다. 그리고 피브리노젠(Baxter AG, Vienna, Austria) 1 ml와 약 60억개의 혈소판을 현탁액 상태로 혼합하여 원심분리용 50 cc 용기에 준비하였다. 0.04 mg/gm 용량의 펜토바르비탈 나트륨(엔도발, 한림제약)으로 생쥐를 복강 내 마취한 후 수술대 위에 사지를 고정하였다. 면도칼을 이용해 등 부위의 털을 깨끗이 제거한 후 포비돈 용액을 이용해 시술 부위를 소독하였다. 시술자의 시야에서 생쥐 등의 좌측을 실험군으로, 우측을 대조군으로 정하고 각각 2군데의 창상을 만들기 위해 먼저 외과용 펜으로 창상의 위치를 표기하였다. 생검용 직경 5 mm 펀치를 이용해 표기한 부위에 좌우 총 4개의 전층 피부 결손 창을 만들었다. 총 9마리의 생쥐에서 실험군 및 대조군 각각 총 18개의 창상이 생성되었다.

1 ml 플라스틱 주사기에 미리 준비된 혈소판-피브리노젠 혼합액( $3 \times 10^8$ 개의 혈소판 포함) 0.05 ml를 취한 후 생쥐의 좌측 창상 부위에 도포하였다. 한 단위의 PCBB를 3마리의 생쥐에 사용하여, 총 3단위의 PCBB가 사용되었다. 대조군인 우측 창상 부위에는 혈소판이 포함되지 않은 동량의 피브리노젠만을 도포하였다. 그리고 0.05 ml의 트롬빈(Baxter AG, Vienna, Austria)을 좌우 각각의 창상에 추가 도포하여 실험군의 경우 혈소판의 활성화 및 고정을 도모하였다. 수분 경과 후 OPSITE FLEXIFIX(Smith and Nephew, USA)로 창상을 포함하여 털이 제거된 부위를 넓게 덮은 뒤에 우레탄 폼 드레싱 제제인 메디폼(Ildong Pharm., Seoul, Korea)을 적절히 잘라서 쥐의 몸통을 한바퀴 감싸고 외과용 테이프 및 소독된 스테플러로 고정하였다.

시술 후 10일째에 생쥐들을 4 mg/gm 용량의 펜토바르비탈 나트륨을 생쥐의 복강에 주입하여 희생시키고 드레싱을 제거한 후 창상의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 또한 치유된 창상의 조직학적 검진을 위하여 6 mm 펀치를 이용해 창상 부위를 생검하였다. 생검 시에는 창상 주변의

정상 피부를 포함해 창상 부위의 손상을 최소화하였으며, 생검된 조직은 10% 중화 완충 포르말린액에 고정하였다. 생검된 조직을 조직학적 검사를 위해 파라핀에 묻은 뒤, 창상의 가장 넓은 가장자리를 포함하는 시상면으로 3  $\mu$ m 간격의 절제를 시행하였다. 자일렌(Duksan Chem., Daejeon, Korea)으로 1분간 처리하여 파라핀을 녹인 뒤 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하였다.

표본이 대조군인지 실험군인지 모르는 해부병리과 의사에 의해 조직학적 관찰이 시행되었다. 창상치유의 정도를 정량화하는 방법으로 상피세포의 재생정도를 계측하기로 하였고, 이를 위해 표본 상에서 창상 경계로부터 중앙을 향해 재생된 상피세포층을 확인한 후 중앙부위의 재생되지 않은 부분의 길이를 현미경 시야 하에서 측정하였다. 이 간격을 '최대 상피 결손부 거리(Epithelial Gap)'로 명명하고 실험군과 대조군의 데이터를 각각 수집하여 비교하였다.

### 다. 통계처리

Mann-Whitney U 테스트를 통해 통계학적 비교가 이루어졌으며, 결과는 평균  $\pm$  표준편차의 형태로 표시되었다. 통계학적 유의성은 5% 유의수준으로 검정하였다.

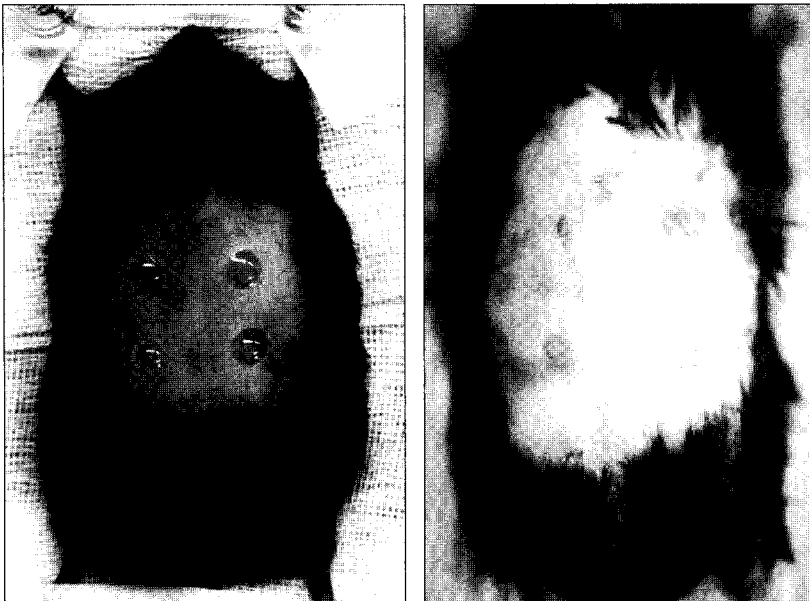
## III. 결 과

생쥐는 모두 마취 및 창상 시술에 잘 적응하였고, 시술 당시 및 경과 관찰 기간에도 누락된 개체는 없었다. 육안적인 관찰결과 실험군과 대조군의 창상에는 팔목할 만한 크기의 차이가 있었다. PCBB로 치료한 실험군의 창상은 대조군에 비해 빠른 속도로 치유됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

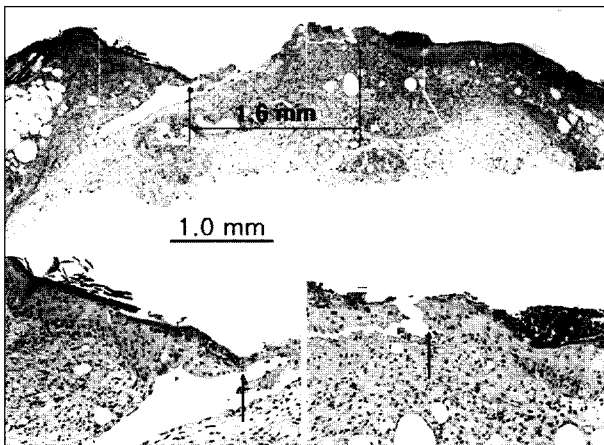
창상의 조직학적 검사를 통해서도 결손된 피부의 창상이 피브린 및 콜라겐 섬유로 구성된 육아조직으로 채워지고 있으며, 그 사이사이에 섬유아세포가 산재되어 있고 창상의 가장자리 경계 부위로부터 상피세포가 성장하고 있다는 사실을 발견할 수 있었다. 실험군은 결손부의 조성, 콜라겐 섬유의 구성 및 염증세포의 침윤 등에 있어서 대조군과 유사하였다. 양측군의 어떠한 검체에서도 완벽한 재생피화를 확인할 수는 없었다. 그러나 최대 상피 결손부 거리에 있어서는 두군 간의 뚜렷한 차이를 발견할 수 있었다. 실험군의 평균 최대 상피 결손부 거리는  $2.5 \pm 0.6$  mm였으며, 대조군의 경우는  $3.6 \pm 0.5$  mm이었다( $p < 0.05$ , Fig. 2-6, Table I).

## IV. 고 찰

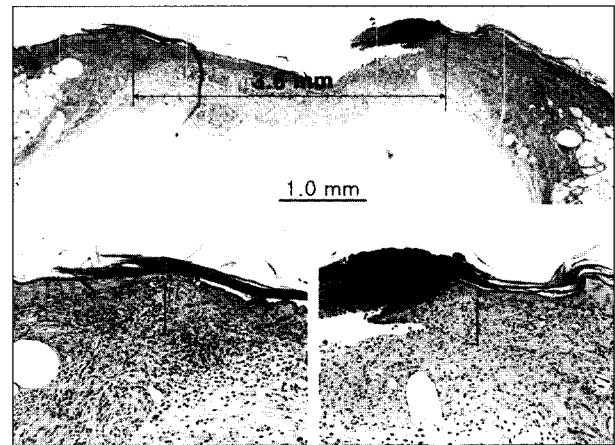
일반적으로 급성 창상은 응고기, 염증기, 세포 증식 및 기질의 복구기를 거쳐 상피의 재생과 반흔 조직의 재구성



**Fig. 1.** (Left) Immediate post-treatment view. The platelet-fibrin mixture was applied on the left hand side wounds and fibrin without platelets on the right hand side wounds. (Right) Ten days after treatment. PCBB treated wounds show superior result than control wounds.



**Fig. 2.** Histology of a specimen which showed the shortest epithelial gap distance of 1.6 mm in a PCBB treated group. (Above)  $\times 40$ , (Belows)  $\times 100$ . Arrows indicate the ends of epithelization. Only fibrotic tissue is seen in between the epithelization ends.



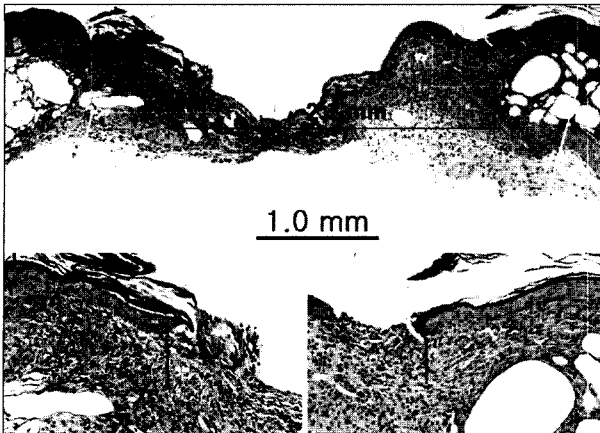
**Fig. 3.** Histology of a specimen which showed the longest epithelial gap distance of 3.6 mm in a PCBB treated group. (Above)  $\times 40$ , (Belows)  $\times 100$ . Arrows indicate the ends of epithelization. Only fibrotic tissue is seen in between the epithelization ends.

을 통해 치유되는 것으로 알려져 있으며, 이 같은 정상적인 창상치유 과정에는 세포성장인자를 비롯한 다양한 세포분비물질이 관여하는 것으로 밝혀져 있다. 난치성의 만성 창상의 경우 염증기에 고착되어 더 이상의 창상치유가 진행되지 않으며, 그 원인으로 세포분비물질의 양적, 질적 감소가 지목되고 있다.<sup>1</sup> 당뇨 환자의 경우 동맥경화 및 면역기능의 저하로 창상치유 능력이 현저하게 떨어져 있어서, 이 같은 세포분비물질의 감소는 더욱 심각한 결과를 초래할 수 있다.

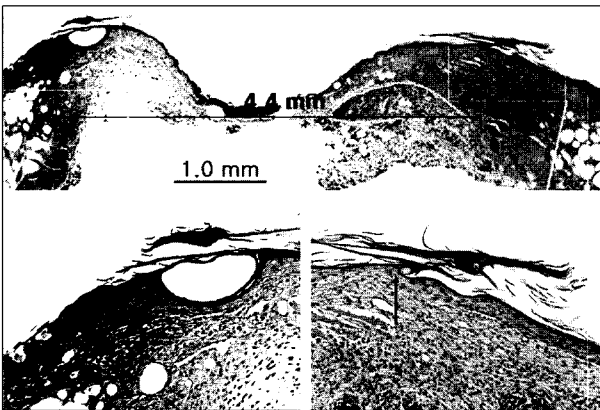
혈소판은 platelet-derived growth factor(PDGF-AA, PDGF-BB, and PDGF-AB), transforming growth factor- $\beta$

(TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2), vascular endothelial growth factor (VEGF), epithelial growth factor(EGF) 등 다양한 성장인자를 분비하는 것으로 알려져 있다.<sup>2</sup> Kington 등<sup>3</sup>에 의해 platelet derived wound healing formula(PDWHF)가 개발되어, 혈소판으로부터 유리된 성장인자를 국소적인 치료에 도입한 이래로 이에 관한 많은 연구가 진행되었다. 그 결과 자가 혈소판을 활용한 PDWHF<sup>3-6</sup>뿐만 아니라 동종 혈소판의 PDWHF<sup>7</sup>도 만성 창상치유에 유용하다는 결론을 얻을 수 있었다.

자가 혈소판을 활용하여 창상치유에 활용하는 것은 인체의 면역체계를 고려할 때 가장 이상적인 치료법임에 틀

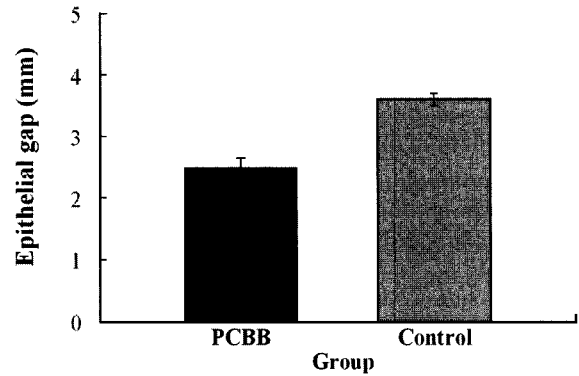


**Fig. 4.** Histology of a specimen which showed the shortest epithelial gap distance of 2.7 mm in a control group. (Above)  $\times 40$ , (Below)  $\times 100$ . Arrows indicate the ends of epithelization. Only fibrotic tissue is seen in between the epithelization ends.



**Fig. 5.** Histology of a specimen which showed the longest epithelial gap distance of 4.4 mm in a control group. (Above)  $\times 40$ , (Below)  $\times 100$ . Arrows indicate the ends of epithelization. Only fibrotic tissue is seen in between the epithelization ends.

림없다. 그러나 재생주기가 일정한 혈소판의 특성상 자가 채취할 수 있는 혈소판의 양은 제한적일 수 밖에 없으며, 당뇨병과 같은 만성 전신 질환자의 전신상태를 고려할 때 혈액채취 자체가 가져오는 혈 역학적 부담을 고려하지 않을 수 없다. 또한 채취된 전혈로부터 혈소판을 추출하는 과정에 따르는 경제적인 부담도 치료의 걸림돌이 될 수 있다. 따라서 저자들은 안전하고 쉽게 공급받을 수 있는 혈액은행 제조의 혈소판 농축액을 당뇨 형질을 가진 생쥐의 창상 치료에 활용함으로써 그 효능을 확인하고자 하였다. 그리고 사람간의 동종 실험에 앞서 당뇨 형질을 가진 생쥐를 이용하여 혈소판의 창상치유 능력을 검증하는 실험을 수행하였다.



**Fig. 6.** A graph showing the results of the epithelial gap distance.

Table I. Epithelial Gap (mm)

| Groups        | PCBB treatment | Control       |
|---------------|----------------|---------------|
|               | 2.0            | 3.0           |
|               | 1.7            | 3.5           |
|               | 2.2            | 3.6           |
|               | 2.1            | 4.1           |
|               | 3.0            | 2.7           |
|               | 2.9            | 3.0           |
|               | 1.6            | 2.8           |
|               | 2.0            | 3.5           |
|               | 2.5            | 3.5           |
|               | 3.6            | 3.6           |
|               | 3.2            | 4.0           |
|               | 2.8            | 3.7           |
|               | 2.2            | 3.5           |
|               | 2.0            | 3.8           |
|               | 3.0            | 4.4           |
|               | 2.9            | 3.9           |
|               | 2.8            | 4.1           |
|               | 3.6            | 3.5           |
| Mean $\pm$ SD | 2.5 $\pm$ 0.6  | 3.6 $\pm$ 0.5 |
| P-value       | 0.000          |               |

유전적으로 당뇨형질(db/db)을 가진 생쥐는 체세포 열성 돌연변이로서, 시상하부 랩틴 수용체가 결손된 상태이다. 따라서 식욕이 증가하고, 에너지 소모는 감소하며, 비

만증 및 고혈당증이 초래되어 결과적으로 사람의 제 2형 당뇨병과 유사한 상태가 된다. 창상치유 능력도 저하된 상태로, 창상치유를 위한 국소도포제의 효능을 연구하는데 많이 사용되고 있다.<sup>9,10</sup> 한편 정상 생쥐의 창상이 90% 이상 수축에 의해 치유되는 반면에, db/db생쥐는 수축능력은 떨어지고 상피화의 정도가 더 높게 나타난다.<sup>9,12</sup> 따라서 수축에 의한 창상치유 능력이 떨어지는 인간의 만성 창상을 연구하는데 가치 있는 실험 모델이 되고 있다.

사람의 피부 창상이 재상피화 되는데 있어서 창상의 가장자리로부터 각질세포가 이동하는 과정은 필수적이다. 당뇨 환자의 만성 창상에서 각질세포는 창상의 가장자리에서 증식은 하지만 이동은 못하는 상태로 고착되어있으며,<sup>11</sup> 상피 기저막의 고정 기질인 라미닌<sup>5</sup>가 이러한 각질세포의 이동을 조절하는 핵심적인 역할을 수행하고 있다고 알려져 있다.

유전자 변이가 일어난 생쥐의 경우 대략 8-12주에 혈장 인슐린치 및 고혈당치가 최고 수준에 이른다는 보고<sup>9,12</sup>를 참고로 하여, 연구에 사용된 생쥐의 혈통과 나이를 선택하였다. 창상의 크기 또한 db/db 생쥐 모델을 활용한 연구<sup>13,14</sup>를 참고하여 결정하였다. 기존의 연구에서 1.5 × 1.5 cm 크기의 절제 상처가 약 50여일의 치유 기간을 필요로 하였다. 하지만 db/db 생쥐의 상처를 장기간 유지 관찰하는 것이 용이하지 않다는 사실을 고려하여, 본 연구에서는 직경 5 mm 크기의 창상을 만들어 치유기간을 단축하고자 하였다. 동일한 쥐의 좌측과 우측을 각각 실험군 및 대조군으로 나누어 양측에 머리쪽 및 꼬리쪽으로 두 군데의 창상을 만들었다. 머리쪽과 꼬리쪽의 창상이 치유과 정상 차이를 보인다는 보고<sup>15</sup>가 있었으므로, 두 위치의 차이 또한 비교해보고자 하였다.

저자들은 사람의 제 2형 당뇨병과 유사한 상태의 당뇨 생쥐를 활용한 창상치유 실험을 통하여, 자가 혈소판이 아닌 혈액은행의 혈소판 농축액을 사용하더라도 그 효과를 충분히 기대할 수 있음을 확인할 수 있었다. 동종이 아닌 이종의 혈소판을 이용한 동물실험에서 육안적으로 뿐만 아니라 조직학적으로도 치유 능력을 확인하였으므로, 사람간의 동종 혈소판 농축액을 활용할 경우 더 큰 효과를 기대할 수도 있을 것이다. 따라서 이식된 동종 혈소판의 성장인자 분비능에 관한 보다 정밀한 정량적 분석을 시도하고, 동종간의 창상치유 실험을 수행하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

혈액은행으로부터 공급받은 혈소판 농축액을 당뇨 생쥐의 전측 피부 결손 창에 국소적으로 사용한 결과, 혈소판

농축액을 사용하지 않은 대조군에 비해 육안적으로나 조직학적으로 현저하게 창상치유가 촉진된다는 사실을 확인할 수 있었다. 혈액은행의 혈소판 농축액은 만성 창상의 치유에 효능이 있으며, 따라서 동종 혈소판을 이용한 당뇨 족부 궤양의 치료도 시도해 볼 가치가 있을 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- Han SK, Choi KJ, Kim WK: Clinical application of fresh fibroblast allografts for the treatment of diabetic foot ulcers: a pilot study. *Plast Reconstr Surg* 114: 1783, 2004
- Marx RE: Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 489, 2004
- Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL: Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors(PDWHF). *Ann Surg* 204: 322, 1986
- Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F: Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 170: 56, 1990
- Krupski WC, Reilly LM, Perez S, Moss KM, Crombleholme PA, Rapp JH: A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: a preliminary report. *J Vasc Surg* 14: 526, 1991
- Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA: Effectiveness of platelet releasate for treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 483, 2001
- Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A: Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci* 30: 145, 2004
- Hong YT, Han SK, Lee BI, Kim WK: Level of Platelet Derived Growth Factor(PDGF) in Blood Bank Platelet Concentrate. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 27:437,2000
- Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pellemounter MA, Danilenko DM: Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology* 141: 446, 2000
- Lim F, Karmacharya J, Gordon A, Martin B, Edelman B, Radu A, Kirschner R, Satymoorthy K, Herlyn M, Crombleholme TM: Adenoviral-mediated angiopoietin-1 overexpression accelerates re-epithelialization in impaired wound healing. *Wound Repair Regen* 9: 155, 2001
- Olerud JE, Usui ML, Gibran NS, Muffley LA, Mansbridge JN, Carter WG: The epithelial cells in wound margins of diabetic ulcers are highly proliferative. *J Invest Dermatol* 114: 857, 2000
- Atit RP, Crowe MJ, Greenhalgh DG, Wenstrup RJ, Ratner N: The Nf1 tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112: 835, 1999
- Gibran NS, Jang YG, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, Usui ML, Larsen J, Smith DG,

- Bunnett N, Ansel JC, Olerud JE: Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *J Surg Res* 108: 122, 2002
14. Yamamoto T, Horikawa N, Komuro Y, Hara Y: Effect of topical application of a stable prostacyclin analogue, SM-10902 on wound healing in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 302: 53, 1996
15. Martson M, Viljanto J, Laippala P, Saukko P: Cranio-caudal differences in granulation tissue formation: an experimental study in the rat. *Wound Repair Regen* 7: 119, 1999