

가토의 두개 결손부에서의 실크 단백질과 platelet-rich fibrin (PRF)의 골형성 효과

송지영¹ · 권해용² · 권광준¹ · 박영욱¹ · 김성곤¹

¹강릉원주대학교 치과병원 구강악안면외과, ²농촌진흥청

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:250-4)

The bone regenerative effect of silk fibroin mixed with platelet-rich fibrin (PRF) in the calvaria defect of rabbit

Ji-Young Song¹, HaeYong Kweon², Kwang Jun Kwon¹, Young-Wook Park¹, Seong-Gon Kim¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Korea

²National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, Korea

Introduction: This study evaluated the bone regenerative effect of silk fibroin mixed with platelet-rich fibrin (PRF) of a bone defect in rabbits.

Materials and Methods: Ten New Zealand white rabbits were used for this study and bilateral round shaped defects were formed in the parietal bone (diameter: 8.0 mm). The silk fibroin mixed with PRF was grafted into the right parietal bone (experimental group). The left side (control group) was grafted only PRF. The animals were sacrificed at 4 weeks and 8 weeks. A micro-computerized tomography (μ CT) of each specimen was taken. Subsequently, the specimens were decalcified and stained for histological analysis.

Results: The average value of plane film analysis was higher in the experimental group than in the control group at 4 weeks and 8 weeks after surgery. However, the difference was not statistically significant. ($P>0.05$) The tissue mineral density (TMD) in the experimental group at 4 weeks after surgery was significantly higher than the control group. ($P<0.05$)

Conclusion: Silk fibroin can be used as a scaffold of PRF for rabbit calvarial defect repair.

Key words: Platelet-rich fibrin (PRF), Silk fibroin, Bone regeneration

[paper submitted 2010. 4. 13 / revised 2010. 5. 14 / accepted 2010. 5. 28]

I. 서 론

구강악안면 영역에서 골결손부의 재건에 다양한 외과적 술식이 사용되어 왔으며 최근에 일련의 연구를 통해 여러 가지 치료방법이 도입되고 있다.

현재까지 가장 이상적인 방법은 자가골 이식으로 알려져 있으나¹, 이는 공여부의 제한이나 공여부의 반흔, 이식골편의 흡수, 추가적인 환자의 통증, 감염 등의 이유로 그 사용이 제한적이다^{2,4}. 그 외에 동종골이나 이종골 이식은 공여자나 공여 동물로부터의 질병의 전염과 감염, 그리고 자가

골 이식에 비해 골형성 효과가 낮은 단점이 있다^{5,6}. 따라서 최근에는 platelet-rich fibrin (PRF)가 경조직의 치유 및 재생을 촉진하는 것으로 보고되면서 골결손부에서의 치유 목적으로 사용되고 있다⁷. PRF란 정상치의 혈소판 수($150-400 \times 10^3/dL$)보다 3-7배로 고농도 농축한 것을 말하며 platelet-rich plasma (PRP)와는 달리 제작과정이 단순하고 동일한 결과의 혈소판 농축을 얻을 수 있다⁸. PRF는 다량의 고농도의 성장인자들, platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factors (TGF)- β , insulin-like growth factor (IGF)를 방출하여 골조직 치유를 유도한다⁹. 이 성장인자들은 이식골 치유과정 시 angiogenesis, 화학주성(chemotaxis), 분열촉진(mitosis), stem cell 증식, 골편 간 결합력 제공, 피브린 망을 통한 골전도율을 증가시키는 역할을 함으로써 초기 골재생을 촉진한다¹⁰.

Mark 등¹¹은 혈소판 농축 혈장을 겔(gel)로 만들어 골이식을 한 결과 방사선학적 골성속도가 1.62-2.16배 우수하고 골구조에서의 밀도가 15-30% 개선되었다고 보고하였다.

김성곤

210-701 강원도 강릉시 강릉 대학로 120

강릉원주대학교 치과병원 구강악안면외과

Seong-Gon Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental hospital,

Gangneung-Wonju National University

120 Daehangno, Gangneung, 210-701, Korea

Tel: +82-33-640-2468 Fax: +82-33-641-2477

E-mail: epken@chol.com

* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ007170201006)의 지원에 의해 이루어진 것임.

Robiony 등¹²은 심하게 퇴축된 하악골에 자가골혈소판겔을 주입하고 하악골을 신장한 결과 우수한 골재생이 나타난다고 보고하였다. Choukroun 등¹³은 PRF를 함유한 동결건조이식골(freeze dried bone allograft, FDBA)를 이용한 상악동 거상술 시에 control group에 비해 4개월 정도 골재생이 빠름을 보고하였다.

섬유상 단백질인 실크(silk)는 예로부터 비단이나 수술용 봉합재료로 사용되어 온 단백질이고 누에와 같은 유충에서 만들어진다고 알려져 있다. 실크는 매우 강한 인장력을 보이며 수용액 상태에서 용해도가 매우 낮은 특성을 보인다¹⁴. 이러한 실크 단백질은 상아질 막 단백질-1(dentin matrix protein-1)과 함께 수산화 인회석(hydroxyapatite)을 nucleation 시킬 수 있는 기능을 가지는 융합 단백질을 생물학적으로 합성할 수 있다고 보고하였다¹⁵.

이에 본 연구는 골결손부에서의 골형성을 촉진시킬 수 있는 방법들 중 하나로 누에에서 추출한 실크 단백질에 혈소판 농축 혈장을 혼합하여 가토의 골결손부에 직접 주입하여 방사선상 골질변화 및 골밀도변화의 측정과 조직학적 분석을 통한 실크 단백질 및 혈소판 농축 혈장의 골생성에 대한 효과를 평가하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 가토(체중 2.0-2.5 kg, 뉴질랜드산) 10마리를 실험동물로 사용하였으며 실온에서 고품사료와 물을 이용하여 일정 기간 사육하였다.

2. 실험재료

사용된 실크 단백질은 농촌진흥청(Suwon, Korea)에서 제공받은 것을 사용하였다. PRF는 수술 직전 가토의 귀 정맥에서 5 cc syringe을 이용하여 혈액 5 cc를 채취하고 3,000 rpm으로 12분간 원심분리 후 최종적으로 혈액이 3층으로 분리되면 중간층을 0.6-0.8 cc 정도 채취하였다.(Fig. 1)

3. 동물실험

술전에 0.4 mL의 Ketamine 100 mg/mL (Ketara, Yuhan, Seoul, Korea)과 xylazine hydrochloride 10 mg/kg (Rompun, Bayer Korea, Seoul, Korea)을 가토의 대퇴부 근육에 주사하여 전신마취를 시행하였다. 전두 부위에서 코 부위까지 체모를 하고 povidone-iodine으로 소독한 후 1:100,000 에피네프린을 함유한 2% 리도카인을 주사하였다. 양쪽의 귀를 잇는 부위로부터 5 cm 전방 부위까지 두피의 정중앙 부위를 절개한 후 골막 하 박리를 이용하여 두개골 vault의 골막을 벗겨 측두골을 노출시킨다. 8 mm 직경의 trephine bur를 이



Fig. 1. After centrifugation, the blood was separated in 3 layer. We used middle layer for grafting.

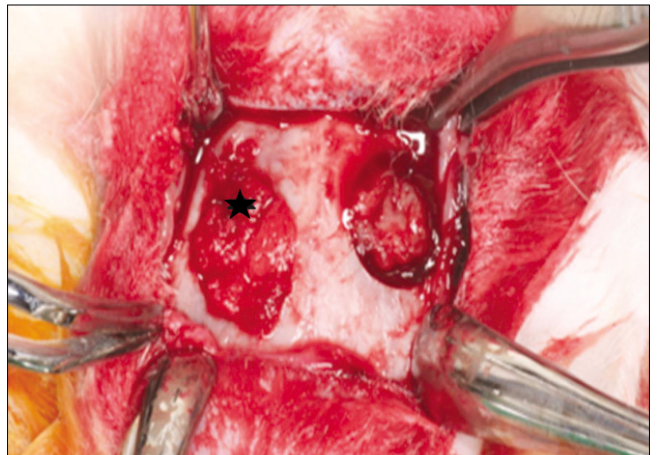


Fig. 2. The silk protein mixed with PRF was grafted into the right parietal bone (experimental group: asterisk) and the left side (control group) was grafted only PRF. (PRF: platelet-rich fibrin)

용하여 좌, 우측에 각각 2개의 직경 8 mm, 깊이 2 mm의 결손부를 형성하였다. 실험군인 우측에는 실크 단백질에 PRF를 섞은 것을 결손부에 이식하고, 대조군인 좌측에 PRF 0.2 cc 정도를 이식한 후(Fig. 2), 골막과 근육을 3-0 실크로 봉합하였다. 모든 실험동물은 술후 감염방지를 위해 gentamycin 1 mg/kg (Kookje, Seoul, Korea)을 하루 3번 3일간 근육주사 하였다.

이후 실험동물을 두 그룹으로 나눠 각각 4주와 8주 후에 희생을 시켰다. 이때 측두골은 pericardium과 dura matter를 견고하게 유지하면서 머리뼈와 분리시켰으며 시편은 10% formalin에 2일 동안 고정시키고 일반 방사선사진과 micro-computerized tomography (μ CT) 촬영, 조직학적 분석을 시행하였다.

4. 방사선학적 분석

술 후 4주 및 8주에 가토를 희생하여 얻어진 시편은 eXplore Locus SP scanner (GE Medical Systems, London, Canada)를 이용하여 0.05 mm의 thickness로 촬영하였으며 이렇게 얻어진 이미지는 MicroView software (GE Medical Systems, London, Canada)를 이용하여 재구성하였다. 이후 software를 이용하여 defect 부위의 bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD), tissue mineral content (TMC), tissue mineral density (TMD)를 계산하였다. 또한 일반 방사선사진을 분석하여 실험군과 대조군에서 방사선 불투과상의 비율을 계산하였다.

5. 조직학적 검사

술 후 4주 및 8주에 가토를 희생하여, 조직괴를 형성 후 2일간 10% 중성 포르말린에 고정하고, formic acid로 7일간 탈회한 후, 통상적인 방법에 의하여 탈수 및 파라핀 포매를 하였으며, 4-6 μm의 표본을 poly-L-lysine을 도포한 슬라이드에 부착하여 표본을 제작하였다. 조직절편에는 골이식 부위 및 정상 부위가 모두 포함되도록 제작하였으며 신생 골과 섬유조직의 형태 관찰과 변화를 알아보기 위해 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

6. 분석방법

한 동물 안에 있는 샘플을 분석하기 위하여 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), paired t test를 이용하였다. 통계적으로 유의한 범위는 $P < 0.05$ 이다.

III. 결 과

1. 방사선학적 분석결과

골결손부의 일반 방사선사진 분석에서 4주와 8주 모두 실험군에서 대조군보다 방사선 불투과상의 비율이 높은 것으로 나타났다. 하지만 통계분석에서는 4주와 8주 모두

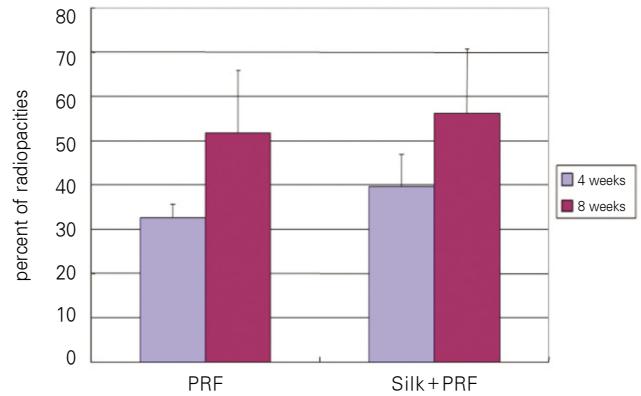


Fig. 3. Percent radiopacities within the PRF (test) and PRF+Silk (control) defects.

대조군과 실험군에서 유의할만한 차이는 보이지 않았다.(Fig. 3)

μCT를 통해 새로 형성된 골을 분석해 본 결과 4주의 TMC, TMD 값이 실험군에서 대조군보다 높게 관찰되었으며, 통계분석에서는 TMD에서 실험군이 대조군보다 유의할만한 증가를 나타냈다($P < 0.05$). 8주경에는 TMD 값이 실험군에서 대조군보다 높게 측정되었으나 통계적으로 유의할만한 차이를 나타내지는 않았다.(Table 1)

2. 조직학적 분석결과

조직 절편을 hematoxylin-eosin 염색을 통하여 살펴본 결과 4주와 8주경 모두 새로운 골의 형성을 보여주는 osteoid island의 형성을 관찰할 수 있었고(Fig. 4), 실험군에서는 macromolecule인 실크 단백질의 degradation을 위해 lymphocyte나 numerous multinucleated giant cells (MNGC)에 의해 매개되는 면역반응을 관찰할 수 있었다. 또한 대조군에서는 남은 결손부에 dense fibrotic tissue가 발견되는 반면 실험군에서는 loose fiber가 주로 발견되었으며, silk의 degradation은 4주에 비해 8주에서 더 많이 진행된 것을 관찰할 수 있었다.

Table 1. Microscopic computerized tomography analysis

Sacrifice time	4 weeks			8 weeks		
	PRF	PRF+SILK	P value ¹	PRF	PRF+SILK	P value ¹
BMC (mg)	365.61 ± 25.10	361.92 ± 25.96	0.19	419.52 ± 20.89	414.32 ± 30.53	0.34
BMD (mg/cc)	1217.63 ± 86.38	1206.43 ± 93.16	0.19	1394.11 ± 70.99	1385.58 ± 102.31	0.42
TMC (mg)	181.56 ± 33.96	193.61 ± 34.61	0.08	236.72 ± 22.80	235.70 ± 39.62	0.47
TMD (mg/cc)	2298.74 ± 116.04	2376.26 ± 135.72	0.04	2412.99 ± 66.95	2425.66 ± 86.76	0.15

(¹: statistically significant $P < 0.05$, BMC: bone mineral content, BMD: bone mineral density, TMC: tissue mineral content, TMD: tissue mineral density)

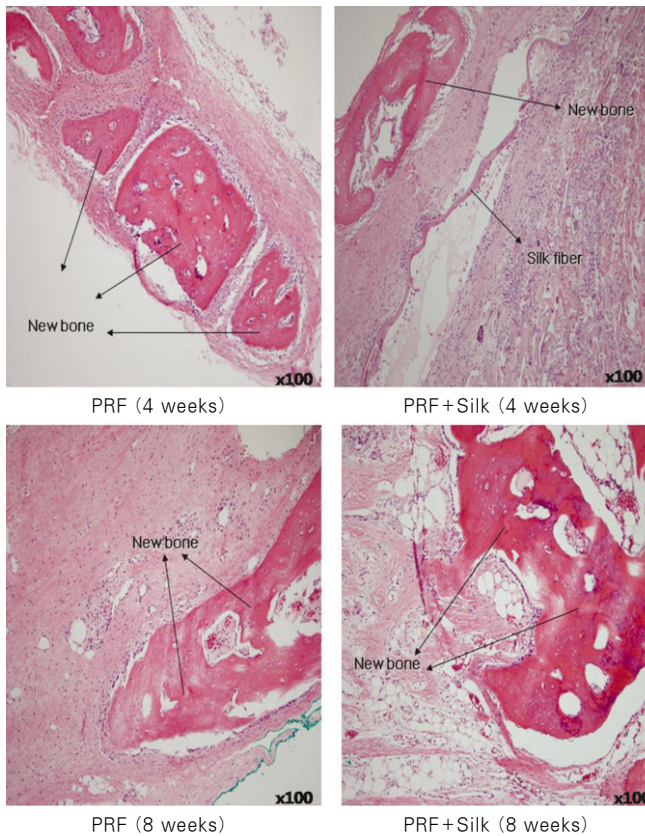


Fig. 4. Histologic section (H&E staining, original magnification $\times 100$). Osteoid formation both in the experimental group and in the control group at 4 weeks and 8 weeks.

IV. 고찰

구강악안면 영역에서 골결손부의 골이식은 흔한 술식이다. 이를 위해서 많은 생체재료나 합성재료가 많이 연구 개발되고 있다. 따라서 이번 논문에서 우리는 새로운 형태의 골이식체인 silk fibroin을 가토의 생체 내에서 얻어진 혈액을 바탕으로 제작된 PRF와 혼합하여 가토의 두개골에 이식할 때와 PRF 단독으로 이식할 때의 골형성 능력을 비교하는 실험을 시행해 보았다. 이번 실험에 사용된 silk fibroin은 *Bombyx mori*에 의해 생산된 이후 조직 비계로써 폭넓게 연구되어지고 있으며¹⁶⁻¹⁸, 섬유소를 길게 늘인 fibrous protein으로 다양한 곤충과 거미로부터 얻어지며, 저렴하게 생산할 수 있고, 우수한 생체 적합성을 가지며 조직 내에서 천천히 분해되며 가소성을 가진다^{19,20}. 젤라틴과 hydroxyapatite 등과 혼합하여 다양한 형태, 예를 들면 fibroin 용액이나, 필름 또는 스폰지 형태로 적용할 수 있으며 4가지 구조를 가지며 서로 다른 조합으로 구성되어 있다: 1) elastic β -spirals 2) crystalline β -sheets rich in alanine 3) tight amino acid repeats forming α -helices 4) spacer regions. 다른 동종 이식재나 이종 이식재와는 달리 교차감염의 위험

이 없으며 조작의 간편함이나 다른 기존의 재료와의 혼합성이 우수하다. 또한 silk 단독으로의 골형성 인자의 부재를 해결하기 위해 여러 가지 재료와 혼합하여 구조를 변경시켰는데 silk fibroin 필름에 화학적으로 혼합된 arginin-glycin-aspartic acid (RGD) peptide는 이미 이전 연구에서 *in vitro*에서 osteoblast-like cell들이 RGD peptides (Arg-Gly-Asp)과 커플을 이루어 fibroin 필름에 부착하여 성장하면서 mineralized matrix를 생성하여 골형성을 유의하게 증가시키는 것으로 보고되어 있으며^{21,22}, 이외에 혼합된 bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)와 nano-hydroxyapatite도 silk fibroin scaffold의 골형성을 유의하게 증가시키는 것으로 보고되었다¹⁷.

Silk fibroin protein에 혼합된 PRF는 환자로 부터 얻어지는 재료로서 면역반응이나 염증반응과 관련된 우려가 적으며, 혈소판이 풍부하고 여러 개의 성장인자를 가진 것으로 보고되었고 그중 platelet-derived growth factor (PDGF)는 정상 골형성세포의 성장을 촉진한다고 알려져 있다⁹. 이번 실험결과 일반 방사선 분석에서는 실험군이 모두 대조군에 비해 새로운 골의 형성이 높은 것으로 나타났으나 그 양에서 유의할 만한 차이를 나타내지는 못했고, μ CT 분석에서도 만족할 만한 결과를 얻지는 못했다.

하지만 이번 실험결과에서 우리는 silk fibroin이 PRF의 scaffold로서 가능성을 확인할 수 있었다. 아마도 고분자 물질인 silk fibroin의 흡수가 너무 느리게 진행되는 점이 신생골의 형성에 장애가 된 것으로 추측된다. 실크 단백질의 생체 내 흡수 속도는 실크 단백질의 분자량을 조절하거나 가공방법을 달리함으로써 획득될 수 있다는 보고를²³ 감안하면 현재 형태의 실크 scaffold를 좀 더 개선할 수 있다면 좋은 형태의 scaffold로서 PRF와 혼합하여 사용할 수 있다고 생각한다. 또한 최근 연구논문을 살펴봐도 silk와 PRF를 동시에 임플란트 주변에 이식하거나, 가토의 두개골에서 silk와 PRF의 혼합이식과 아무것도 이식하지 않은 것과 비교했을 때 두 연구 모두에서 silk와 PRF의 혼합이식이 매우 유의성있는 이식재료라는 보고를^{24,25} 감안할 때 그 연구가치는 충분하다고 사료된다. 다만 이번 연구는 가토에서 실행한 단기간의 연구이므로 사람에게 직접적으로 적용하기는 어렵다. 이를 위해서는 좀 더 추가적인 연구가 필요하다.

V. 결론

본 연구에서 인공적으로 형성한 가토의 두개골 결손부의 우측에는 실험군인 실크 단백질에 PRF를 섞은 것을 이식하고, 좌측에는 대조군인 PRF를 이식한 후 4주, 8주 후 실험동물을 희생하여 조직통계학적으로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 일반 방사선사진 분석에서 4주와 8주 모두 실험군이 대조군보다 신생골 형성 비율이 높았지만 통계학적으로

로 유의할만한 수준은 아니었다.($P>0.05$)

2. μ CT 분석에서 4주째 실험군의 TMD 수치가 대조군보다 통계적으로 유의할 만하게 높았다.($P<0.05$)
3. 조직학적 분석에서 실험군이 4주째보다 8주째 실크의 생체분해가 더 많이 일어났다.

이를 바탕으로 우리는 실크 단백질의 비계로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 실크의 분자량을 조절하거나 가공방법을 달리하여 실크가 좀 더 빨리 생체 분해되게할 수 있다면 좀 더 나은 실험결과를 보일 것이다. 추후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하겠다.

References

1. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. *Periodontol* 2000 1999;19:151-63.
2. Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:933-8.
3. Sommers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br* 1989; 71:677-80.
4. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-5.
5. Friedlaender GE, Horowitz MC. Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics* 1992; 15:1171-5.
6. Carlson ER, Marx RE, Buck BE. The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risk and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:17-23.
7. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 2002;18:27-33.
8. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-8.
9. Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:157-63.
10. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:161-5.
11. 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.
12. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:630-5.
13. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:299-303.
14. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, *et al.* Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003;24: 401-16.
15. Huang J, Wong C, George A, Kaplan DL. The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials* 2007;28:2358-67.
16. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, *et al.* Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005;37:688-98.
17. Hirano Y, Mooney DJ. Peptide and protein presenting materials for tissue engineering. *Adv Mater* 2004;16:17-25.
18. Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U. *De novo* engineering of reticular connective tissue *in vivo* by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials* 2005;26:1987-99.
19. Stitzel J, Liu J, Lee SJ, Komura M, Berry J, Soker S, *et al.* Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 2006;27:1088-94.
20. Chan CK, Kumar TS, Liao S, Murugan R, Ngiam M, Ramakrishnan S. Biomimetic nanocomposites for bone graft applications. *Nanomedicine (Lond)* 2006;1:177-88.
21. Zhao J, Zhang Z, Wang S, Sun X, Zhang X, Chen J, *et al.* Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone* 2009;45:517-27.
22. Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, Kaplan DL. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27:3115-24.
23. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci* 2009;10:1514-24.
24. Jang ES, Park JW, Kweon H, Lee KG, Kang SW, Baek DH, *et al.* Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:831-6.
25. Kim JY, Choi JY, Jeong JH, Jang ES, Kim AS, Kim SG, *et al.* Low molecular weight silk fibroin increases alkaline phosphatase and type I collagen expression in MG63 cells. *BMB Rep* 2010; 43:52-6.