

혈액은행 혈소판농축액의 혈소판유래성장인자 분비능

홍용택 · 한승규 · 이병일 · 김우경

고려대학교 의과대학 성형외과학교실

Level of Platelet Derived Growth Factor(PDGF) in Blood Bank Platelet Concentrate

Yong Taek Hong, M.D., Seung Kyu Han, M.D.,
Byung Il Lee, M.D., Woo Kyung Kim, M.D.

Department of Plastic Surgery, Korea University College of
Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The purpose of this pilot study was to investigate a potential of platelet concentrate obtained from blood bank(PCBB) in accelerating wound healing and to determine an effective treatment protocol by quantifying levels of platelet derived growth factor (PDGF)-BB in PCBB *in vitro*.

Methods: The first study was designed to investigate quantity of PDGF-BB over stored time of the PCBB. The stored times for each PCBB were 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 days. The second study was designed to determine efficacy of adding thrombin to stimulate release of PDGF-BB from the platelets of PCBB. The platelets were suspended and incubated in either with or without thrombin. On 30 minutes and days 1, 3, 5, 7 after incubation, the levels of PDGF-BB were measured.

Results: PDGF-BB level showed a linear decrease over stored time of PCBB from the first day to the 13th day. Addition of thrombin increased PDGF-BB release from 30 minute through the 5th day.

Conclusion: The results indicate that PCBB can provide sufficient amount of growth factors to stimulate wound healing and adding thrombin accelerate it.

Key Words: Platelet, Wound healing, Blood bank

Received March 8, 2006

Revised June 9, 2006

Address Correspondence: Seung Kyu Han, M.D., Department of Plastic Surgery, Korea University Guro Hospital, 97 Guro-dong, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea. Tel: 02) 818-6698 / Fax: 02) 868-6698 / E-mail: pshan@kumc.or.kr

* 본 논문은 2005년 제 59차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

I. 서론

인구의 고령화, 식생활 및 생활방식의 변화 등으로 당뇨병 등 만성질환 환자 수가 크게 증가하고 있다. 당뇨병은 동맥경화로 인한 혈행장애, 모세혈관 기저막의 비후, 당뇨병성 말초신경병증, 감염에 대한 저항성 약화, 성장인자(growth factor)의 부족 및 파괴, 고혈당으로 인한 세포대사의 변화 등¹으로 인해 기존의 고식적인 치료 방법으로는 치료 결과가 좋지 않다. 최근 당뇨병 케양치료를 위해 성장인자를 국소적으로 도포하는 방법이 많은 관심을 끌고 있으나 이 역시 기대만큼 그 효과가 만족스러운 것은 아니다. 성장인자를 공급하는 다른 방법으로 각질세포나 섬유아세포를 창상에 이식하는 방법도 개발되었다. 이 방법은 창상의 상태에 맞추어 여러 부족한 성장인자를 적절한 시기 및 양으로 공급할 수 있다는 이론적 장점이 있는 반면에 세포의 냉동보관 및 과도한 증식으로 인해 세포의 활성도가 떨어지는 단점이 있다. 따라서 냉동시키지 않고 과다한 세포증식을 시키지 않은 신선한 섬유아세포의 동종이식을 이용한 좋은 치료 결과가 발표되었으나² 이것은 세포의 공여자가 있어야 하며 식약청 기준에서 조직을 배양할 수 있는 시설 및 기술이 있어야 하는 제한점이 있다.

혈소판 세포의 이용은 이러한 기존의 세포이식방법의 문제점을 극복할 수 있는 방법으로 이미 혈소판 분비물질 추출물 혹은 혈소판 겔(platelet gel)을 이용하여 만성 창상 치료에 좋은 결과를 얻고 있다.³⁻⁸ 그러나 혈소판이식법은 환자 자신의 피를 채혈하여 혈소판 분비물질 추출물을 얻기 위한 과정을 거쳐야 하며 이것을 얻기 위해서는 환자로 부터 많은 양의 피를 채혈해야 한다는 문제점이 있다. 당뇨병을 가진 환자의 상당수가 전신 건강 상태가 좋지 못하며 빈혈을 가진 경우도 많다는 것을 고려하면 많은 양의 혈액을 채혈하는 것은 환자에게 상당히 부담이 된다. 다른 사람의 혈소판을 이식 받을 수도 있겠으나 역시 공여자를 구한다거나 이식을 위한 선별검사(screening test)를 해야 하는 등 번거로운 과정을 거쳐야만 한다. 또한, 혈소판 분리를 위한 장비도 갖추어야 하는 단점도 있다.

따라서 저자들은 만약 혈액은행의 혈소판농축액을 창상

치료에 이용한다면 이러한 제한점들을 극복할 수 있을 것으로 판단하였고 실제 환자들에게 적용하여 좋은 결과를 얻은 바도 있다. 그러나 간단한 예비실험에 의한 자료에 기초하여 치료가 이루어졌을 뿐 충분한 자료와 통계적 검증을 통하여 성장인자 분비능에 관한 연구가 진행된 바 없어 본 실험을 계획하였다. 혈소판이식 치료법이 당뇨족 궤양의 치료법으로 정착되고 효과를 극대화할 수 있는 방법으로 개발되기 위하여는 혈액은행 혈소판농축액이 분비하는 성장인자의 양이 보관기간에 따라 어떻게 변하는지, 성장인자분비를 촉진하기 위해 혼합하는 트롬빈(thrombin)이 일정기간 그 효과를 나타내는지 등에 관한 정보가 필수적이다. 이런 정보가 밝혀져야 사용가능한 혈소판농축액의 보관기간 및 여러 차례 적용 시 혈소판농축액을 적용하는 간격을 정할 수 있다. 또한 트롬빈 첨가가 오랜 기간 동안 성장인자를 분비해야 한다는 세포치료의 장점에 비추어 볼 때 유리한 지도 밝힐 수 있다. 이에 본 저자들은 혈액은행 혈소판농축액의 보관기간에 따른 성장인자의 양적 변화와 트롬빈을 첨가할 경우에 어느 기간까지 성장인자 분비에 유리한지를 연구함으로써 혈액은행 혈소판농축액을 사용하는 창상치료에 있어 효과적인 치료 지침을 제시하고자 한다.

II. 재 료 및 방 법

가. 저장 기간별 혈소판농축액 내의 혈소판유래성장인자(Platelet Derived Growth Factor, PDGF-BB) 함량 측정

우선 저장 기간에 따라 혈액은행의 혈소판농축액에 함유된 혈소판유래성장인자의 양이 어떻게 변화하는지 알아보 고자 하였다. 저자들이 사용한 혈소판농축액은 실험 전날 오전 10시에서 오후 3시 사이에 공여자로부터 채혈되어 혈소판농축액으로 제조된 후 실험 당일 오전 9시 이전에 실험실에 도착한 신선한 것을 사용하였다. 혈액은행에서 공급된 혈소판농축액에서 저장 후 1, 3, 5, 7, 9, 11 그리고 13일째 각각 시료를 채취하여 3,000 × g에서 30분간 원심분리를 하여 약 2 × 10⁸개의 혈소판을 취하고 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12(DMEM/F-12; Gibco, Grand Island, NY) 배지와 혼합하여 6 well 세포배양관에 넣고 37°C, 5% CO₂, 100% humidity에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 3,000 × g에서 30분간 다시 원심분리하여 상층액을 취하고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit(R&D System, Minneapolis, MN)을 사용하여 혈소판유래성장인자 함량을 측정하였다. 총 10단위의 혈소판농축액을 실험하였다.

나. 트롬빈(Thrombin)의 첨가에 따른 혈소판유래성장인자 함량 측정

다음 실험에서는 트롬빈을 첨가함으로써 혈소판에서 혈소판유래성장인자의 유리가 얼마나 촉진되며 성장인자의 농도가 얼마나 유지되는지를 알아보 고자 하였다. 트롬빈을 첨가하지 않은 대조군과 첨가한 실험군을 비교하였는데 혈소판농축액은 실험 전 24시간 내에 채취된 것으로 하였다. 각각의 혈소판농축액에서 약 2 × 10⁸개의 혈소판을 취하고 실험군에 500 IU/ml의 인간 트롬빈(Baxter Healthcare Corp., Vienna, Austria) 200 μl을 대조군에서는 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(Gibco, Grand Island, NY) 같은 양을 첨가하여 위의 실험에서 사용한 것과 같은 방법으로 배양하였으며 실험군과 대조군 간에는 트롬빈 첨가 여부만 다르도록 하였고 다른 조건들은 모두 동일하게 하였다. 배양 후 30분, 1, 3, 5, 7일째에 시료를 채취하여 ELISA를 이용해 혈소판유래성장인자 함량을 측정하였다. 총 4단위의 혈소판농축액을 실험하였다.

다. 통계처리

한 시료 당 3회 실험하여 이들의 평균을 그 시료의 측정치로 사용하였으며 이 값을 다시 10⁶개의 혈소판 당 혈소판유래성장인자의 양으로 환산하여 함량을 정하였다. 모든 결과는 평균±표준편차로 표현하였고 저장 기간별, 대조군과의 비교는 independent sample test인 Mann-Whitney U test를 사용하여 p < 0.05에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

첫 번째 실험에서 저장 기간에 따라 혈소판유래성장인자 함량을 측정한 결과 혈소판 10⁶개 당 1일째에는 5.2 ± 1.2 pg, 13일째에는 0.5 ± 0.3 pg이었으며(Table I), 저장 기간이 늘어날수록 혈소판유래성장인자의 함량이 비교적 일

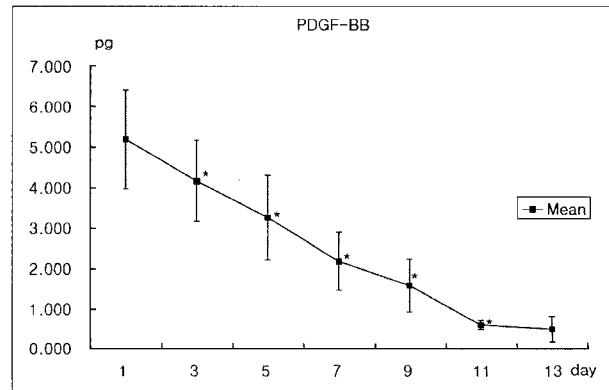


Fig. 1. The PDGF-BB levels per one million platelets over stored time of PCBB. *: p < 0.05.

Table I. The PDGF-BB Levels Over Stored Time of PCBB

Stored time	1 day	3 days	5 days	7 days	9 days	11 days	13 days
	5.47	4.55	3.72	2.58	1.69	0.65	1.41
	5.88	5.07	4.33	3.03	2.72	0.71	0.41
	4.62	3.57	3.08	2.10	1.39	0.58	0.38
	3.65	2.95	2.10	1.37	0.80	0.40	0.36
	2.88	2.33	1.38	0.92	0.60	0.40	0.31
	5.92	4.77	4.03	2.49	1.67	0.64	0.40
	6.17	4.77	4.21	2.78	2.00	0.73	0.43
	7.00	5.38	3.88	2.63	1.81	0.69	0.43
	5.30	4.63	3.77	2.55	2.15	0.66	0.41
	4.94	3.55	2.07	1.33	0.97	0.56	0.39
Mean \pm SD	5.18 \pm 1.22	4.16 \pm 1.00*	3.26 \pm 1.04*	2.18 \pm 0.72*	1.58 \pm 0.65*	0.60 \pm 0.12*	0.49 \pm 0.32
<i>p</i> -value	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31	

pg per one million platelets, *: $p < 0.05$ **Table II.** The Effect of Thrombin on the PDGF-BB Levels

Incubation time	30 min	1 day	3 days	5 days	7 days
Control Group	6.54	6.16	5.04	4.05	3.26
(Without thrombin)	5.39	5.21	4.23	3.20	2.10
	5.06	5.17	4.08	3.15	2.27
	6.11	6.96	5.87	4.19	3.75
Mean \pm SD	5.78 \pm 0.67	5.88 \pm 0.86	4.81 \pm 0.83	3.65 \pm 0.55	2.85 \pm 0.79
<i>p</i> -value		0.74	0.00	0.01	0.01
Thrombin Group	36.25	15.49	9.76	5.27	2.55
	33.24	14.29	9.29	4.31	2.35
	31.15	14.47	9.15	4.05	2.08
	41.27	17.6	10.55	5.27	3.01
Mean \pm SD	35.48 \pm 4.39*	15.46 \pm 1.52*	9.69 \pm 0.63*	4.73 \pm 0.64*	2.50 \pm 0.39
<i>p</i> -value		0.00	0.00	0.00	0.00
<i>p</i> -value between two groups	0.00	0.00	0.00	0.04	0.47

pg per one million platelets, *: $p < 0.05$

정하게 감소하였다. 통계 분석 결과 저장기간이 1일에서 11일째까지는 통계적으로 유의하게 혈소판유래성장인자 함량이 감소하였으며 그 중 9일째(1.6 ± 0.7 pg/ 10^6 혈소판)와 11일째(0.6 ± 0.1 pg/ 10^6 platelets) 사이에 가장 큰 감소를 보였다(Fig. 1).

두 번째 실험의 측정치를 분석한 결과 7일째를 제외한

나머지 시료에서 실험군의 혈소판유래성장인자 함량이 대조군에 비해 상당히 증가되어 있었으며 30분에 측정된 값이 가장 큰 차이를 보였다. 30분에 측정된 혈소판유래성장인자 함량 평균치에서도 실험군에서는 혈소판 10^6 개당 35.5 ± 4.4 pg이었던 반면 대조군에서는 5.8 ± 0.7 pg으로 큰 차이를 보이고 있었고(Table II), 두 군간의 차이는 시간

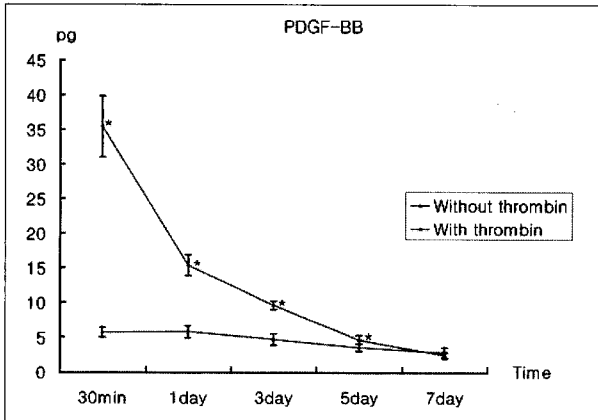


Fig. 2. The effect of thrombin on the PDGF-BB levels per one million platelets. *: $p < 0.05$.

이 지남에 따라 점차 감소하였다(Fig. 2).

IV. 고찰

창상치유는 세포 수준에서 성장 인자와 cytokine 등에 의해 일어나는 일련의 반응에 의한 과정이다. 당뇨 환자에서 창상치유 장애가 나타나는 데는 여러 가지 원인이 있다. 이러한 원인에는 죽상경화, 만성 신부전, 신경병증, 감염에 대한 취약성 등 당뇨 환자의 전신적 합병증과 관련된 것들도 있지만 성장인자 또한 중요한 요소로 작용한다. 당뇨 환자에서는 성장인자의 생성이 감소되어 있을 뿐만 아니라, 단백 분해 효소에 의한 성장인자의 분해도 항진되어 창상 치유 과정에 필요한 성장인자가 부족해지는 현상이 나타난다.²

혈소판의 알파(a) 과립에는 platelet derived growth factor(PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), vascular endothelial cell growth factor(VEGF), transforming growth factor(TGFβ1, TGFβ2), epithelial growth factor(EGF) 등 최소한 7가지 이상의 성장인자가 함유되어 있다.³ 1986년 Knighton 등⁴은 혈소판을 만성창상 치료에 처음으로 사용한 바 있다. Knighton 등은 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)에 트롬빈을 반응시켜 혈소판이 그 내부에 가지고 있는 성장인자를 방출하도록 하고 소모된 혈소판을 제거한 후 성장인자를 포함한 상층액을 만성창상에 도포하는 방법을 사용하였는데 이것을 platelet derived wound healing formula(PDWHF)라고 명명하였다. 자가 혈소판을 이용하여 추출한 PDWHF의 유용성은 많은 문헌에서 검증되었으며^{4,7} 또한 동종 PDWHF도 만성창상 치유에 유용함이 보고되었다.^{8,9}

저자들이 성장인자를 혈액은행의 혈소판농축액에서 얻고자 한 이유는, 첫째 많은 당뇨족 환자들이 빈혈을 가지

고 있으며 혈액학적으로 불안정한 경우도 많아 이러한 환자들로부터 많은 양을 반복적으로 채혈하는 것은 환자에게 상당히 부담이 된다는 것, 둘째는 혈소판을 분리하는데 필요한 추가적인 장비를 요하지 않는다는 것, 셋째는 혈액은행에서 혈소판농축액을 별다른 제한 없이 공급받을 수 있다는 것 등이다.

최근 Eppley 등¹⁰은 Gravitational Platelet Separation System을 사용하여 혈소판풍부혈장의 혈소판유래성장인자 함유량을 정량 분석하였다. 그들의 연구에 따르면 55 ml 전혈로부터 얻은 혈소판풍부혈장 6 ml 내에는 약 9.6×10^9 개의 혈소판이 있으며 혈소판유래성장인자의 함유량은 101 ng이었다. 이것은 혈소판 100만개 당 약 10 pg의 혈소판유래성장인자가 함유되어 있음을 의미한다. 또 다른 연구에 의하면 혈소판 100만개 당 약 60 pg이 함유되어 있다고 보고된 바도 있다.¹¹ 본 연구에서 활성화된 직후 혈소판에서 분비된 혈소판유래성장인자의 양은 혈소판 100만개 당 35.5 pg이었다. 이런 결과를 볼 때 환자 혈액내의 혈소판유래성장인자의 함유량은 혈액은행의 혈소판농축액의 그것과 비슷함을 알 수 있다.

두 번째 실험 결과를 볼 때 혈소판농축액을 트롬빈과 혼합하면 초기에 알파 과립에 함유되어 있던 성장인자의 상당량이 분비됨을 알 수 있다. 실험 전 저자들은 트롬빈의 첨가가 초기에만 성장인자분비를 촉진하여 그 이후에는 오히려 성장인자의 분비가 지속적으로 이루어지지 않을 수도 있을 것으로 가정하였는데, 본 연구결과를 통하여 초기에 다량의 성장인자가 분비됨에도 불구하고 트롬빈 첨가 후 5일까지는 성장인자분비에 훨씬 도움이 됨을 알 수 있다. 혈소판 농축액을 만성창상 치료에 이용시 혈소판유래성장인자가 적정 농도 이상으로 수일간 지속이 되어야 함을 감안하면 혈소판농축액을 트롬빈과 혼합하여 사용하는 것이 더 좋을 것이다.

이번 실험 결과들을 근거로 볼 때 혈액은행의 혈소판농축액을 임상에서 사용 시 그 효과를 극대화하기 위하여는 다음과 같은 점을 고려해야 할 것으로 생각된다. 첫째, 가능하면 저장 기간이 짧은 것을 사용하며 신선 혈소판농축액이 가장 좋겠으나 여의치 않을 경우 보관된 혈소판농축액을 사용하더라도 최대 1주 이내의 것을 사용해야 한다. 둘째, 트롬빈을 함께 도포하고 셋째 반복적인 치료를 요하는 경우 치료 간격을 5-7일로 하는 것이 좋을 것이다. 원래 혈액은행의 혈소판농축액은 수혈목적으로 제조된 것으로 이를 창상치유 치료를 위해 사용하는 것에 대해서는 이견이 있을 수도 있겠으나 본 연구는 혈액은행 혈소판농축액 사용의 창상치유 유도를 위한 가능성에만 초점을 맞추어 시행되었다. 향후 창상치유에 적합한 혈소판의 개수나 혼합하고 트롬빈의 양 등에 관한 추가 연구가 시행되어 이

치료법이 당뇨족 궤양을 위한 확실한 치료방법으로 정착 되길 기대한다.

V. 결 론

혈액은행의 혈소판농축액은 제조 후 9-11일까지 혈소판유래성장인자를 분비하며 이것은 트롬빈을 섞어 주면 첨가 후 5일까지 성장인자의 분비가 더 촉진된다. 또한 혈액은행의 혈소판농축액에 함유된 혈소판유래성장인자의 양은 자가 혈소판농축액에 포함된 것과 비슷하다고 하겠다.

REFERENCES

- Greenhalgh DG: Wound healing and diabetes mellitus. *Clin Plast Surg* 30: 37, 2003
- 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. *Ann Surg* 204: 322, 1986
- Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F: Stimulation of repair in chronic, non-healing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula: a preliminary report. *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
- Atri SC, Misra J, Bisht D, Misra K: Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers. *Surgery* 108: 508, 1990
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J: Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 114: 1502, 2004
- 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* 85: 638, 1998