

## 골용해의 발생기전에서 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 미치는 영향

이우석 · 한창동\* · 김성재\* · 강응식\* · 박중철†

건양대학교 의과대학 정형외과학교실, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실\*, 의학공학교실†

**목적 :** 폴리에틸렌 마모편이 골아세포의 증식과 기질발현에 미치는 영향을 측정하여 골용해의 발생기전에서 골아세포의 역할을 규명하고자 하였다.

**대상 및 방법 :** 신생 백서의 두개골에서 분리 배양한 골아세포에 골용해 조직에서 채취한 폴리에틸렌 마모편을 투여하고, 배양시기에 따른 세포 증식률, alkaline phosphatase 활성도, 제1형 교원질 mRNA 발현, osteocalcin mRNA 발현, 골결절 형성, osteoprotegerin (OPG) mRNA 발현, receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) mRNA 발현을 측정하였다.

**결과 :** 마모편 투여군에서 세포수는 배양 7일째부터 감소하였고, 제1형 교원질 mRNA의 발현은 배양 14일째에 의미있게 증가하였다. 골결절은 배양 7일째부터 나타나 배양기간에 따라 증가하였으나 대조군에서는 관찰되지 않았다. OPG mRNA의 발현은 변화가 없었으나, RANKL mRNA의 발현은 배양 14일째 고농도(4 mg/mL)의 마모편 투여군에서 증가하였다.

**결론 :** 폴리에틸렌 마모편은 백서의 골아세포의 증식을 억제하여 초기에 세포의 기질성숙과 무기질화 과정을 유도한 것으로 판단되며, 파골세포의 활성을 촉진하는 RANKL의 발현을 증가시켰다.

**색인 단어 :** 폴리에틸렌 마모편, 골아세포, 증식, 기질발현, Osteoprotegerin, Receptor activator of NF-kappa B ligand

### Effect of Polyethylene Particles on Osteoblasts in Pathogenesis of Osteolysis

Woo-Suk Lee, M.D., Chang-Dong Han, M.D.\*, Sung-Jae Kim, M.D.\*, Eung-Shick Kang, M.D.\*, and Jong-Chul Park, Ph.D.†

Department of Orthopedic Surgery, Konyang University College of Medicine, Daejeon; Department of Orthopedic Surgery\*, Department of Medical Engineering†, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** To determine the role of osteoblast in the pathogenesis of osteolysis, we evaluated cell proliferation and differentiation of cultured osteoblasts by adding retrieved polyethylene particles.

**Materials and Methods:** We cultured the osteoblasts primarily isolated from rat neonate calvariums and then added polyethylene particles retrieved from osteolysis tissue. We evaluated cell proliferation, alkaline phosphatase activity, the expression of Type I procollagen mRNA, the expression of osteocalcin mRNA, bone nodule formation, and the expression of osteoprotegerin (OPG) mRNA and receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) mRNA according to culture periods.

**Results:** Particle groups showed statistically significant decrease in cell proliferation after the 7th day. The expression of type I procollagen mRNA increased on the 14th day. The bone nodules appeared at the 7th day and increased with time. There was no appearance of bone nodule in the control group. The expression of OPG mRNA in particle groups was not changed. The expression of RANKL mRNA was significantly increased in high concentration particle group (4 mg/mL) on the 14th day.

**Conclusion:** Polyethylene particles ceased the proliferation of osteoblasts and produced early extracellular matrix maturation and mineralization process in vitro and increased the expression of RANKL promoting osteoclast activities.

**Key Words:** Polyethylene particles, Osteoblast, Growth, Differentiation, Osteoprotegerin, Receptoractivator of NF-kappa B ligand

골용해는 인공관절의 마모로 인공관절 주위로 유리된 마모편 (wear debris)에 대한 생물학적 반응으로 보고되고 있으며<sup>1,5</sup>, 대부분의 연구가 대식세포, 섬유아세포, 파골세포 등과 이들 세포에서 분비되는 매개인자(cytokines)에 집중되어져 왔다<sup>5-7,11,15,18,19,22,23</sup>. 그러나 골의 재형성 과정은 골소실과 골형성의 두가지 과정이 균형을 이루면서 일어나는 것으로, 골용해는 대퇴 삽입물 주위에 골흡수의 증가뿐만 아니라 골아세포에서의 신생골 형성

저하에 의한 골 재형성의 실패도 크게 기여할 것으로 볼 수 있다<sup>12,14,20,21</sup>.

최근에는 골아세포에서 생성되어 파골세포의 분화에 관여하는 새로운 인자들이 발견되었는데, receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)는 TNF ligand 계열로 osteoclast differentiation and receptor activator of NF-kappa B (RANK)에 작용하여 파골세포의 형성과 활성도를 증가시키는 것으로 알려

통신저자 : 이우석  
대전광역시 서구 가수원동 685  
건양대학교병원 정형외과학교실  
TEL : 042-600-6905 · FAX : 042-545-2373  
E-mail : wslees@kyuh.co.kr

Address reprint requests to  
Woo-Suk Lee, M.D.  
Department of Orthopedic Surgery, Konyang University Hospital  
685 Gasuwon-dong, Seo-gu, Daejeon 302-241, Korea  
Tel: +82.42-600-6905, Fax: +82.42-545-2373  
E-mail: wslees@kyuh.co.kr

\*본 논문의 요지는 2000년도와 2002년도 대한정형외과학회 추계학술대회에서 발표되었음.

저 있다. 또한 osteoprotegerin (OPG)라는 단백질은 RANKL 수용체와 유사한 용해성 수용체로 RANKL에 강한 친화성을 가지고 있고 RANKL와 RANK의 작용을 억제하는 osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)로 알려져 있어, 골흡수 과정은 OPG와의 RANKL균형을 통해 조절될 수 있다<sup>4,8,13,16,17,21</sup>. 본 연구에서는 백서의 골아세포를 배양하면서 폴리에틸렌 마모편에 노출시켜, 골아세포의 증식과 분화에 미치는 영향과 파골세포의 활성도를 조절하는 OPG와 RANKL의 발현 정도를 분석함으로써 골아세포를 통한 골용해의 작용기전을 밝히고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 폴리에틸렌 마모편의 분리 및 정량

골용해로 인해 인공고관절 재치환술을 시행한 환자의 골용해 부위에서 조직을 채취하여 잘게 자른 후, papain 용액을 첨가하여 65°C에서 24시간 동안 소화시킨 후 초원심 분리하고 최상층에 모인 폴리에틸렌 마모편을 분리하였다<sup>2,3,10</sup>. 주사 전자 현미경 (Hitachi H-500, Tokyo, Japan)상 분리된 폴리에틸렌 마모편의 크기는 평균 0.4 (0.1-1.4)  $\mu\text{m}$ 이었으며, 92% 이상이 1  $\mu\text{m}$  이하였다. 형태는 섬유형이 1%, 구형이 99%로 대부분이 구형이었다<sup>3</sup>. 골용해조직 1 gm당 분리된 폴리에틸렌 마모편의 수는  $5.6 \times 10^8$  ( $2.2 \times 10^6$  -  $1.2 \times 10^9$ )개 이었다(Fig. 1). 일부(10 mg)는 진공 건조시킨 후 electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA, Quantum 2000, PEI, MN, USA)를 이용하여, 분리된 폴리에틸렌 마모편의 화학적 성분을 확인하였다<sup>3</sup>. 나머지 폴리에틸렌 마모편은 에탄올을 증발시킨 후 배양액에 뜨는 것을 방지하기 위해서 10% 우태혈청(Sigma)에 혼합하여 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL의 농도가 되도록 배양액을 준비하였다.

### 2. 골아세포의 분리 및 배양

생후 1일 이내의 Sprague-Dawley계 쥐의 두개골에서 채취한 조직을 잘게 자른 후 효소용액(collagenase 2 mg/mL, DNase

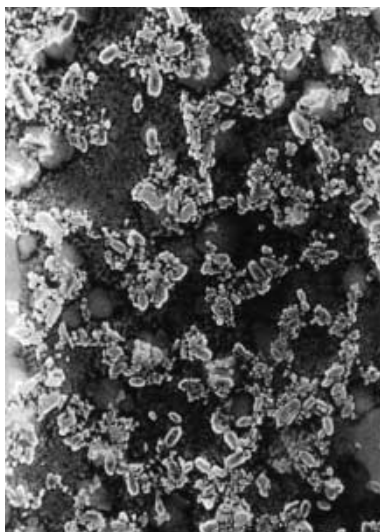


Fig. 1. Scanning electron micrograph shows polyethylene particles retrieved from osteolysis tissue ( $\times 6,000$ ).

I 0.1 mg/mL)에 넣고 단계적으로 효소처리를 하였다. 모아진 세포를 10% 우태혈청, penicillin과 streptomycin (100 U/mL, Gibco BRL)이 함유된 low glucose Dulbecco's modified essential medium (DMEM)으로 75 cm<sup>2</sup> 배양용기에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 3. 실험군 및 세포 증식률(cell proliferation) 측정

일차 배양된 골아세포를 혈구계(hemocytometer)로 세포수를 측정된 다음 직경 100 mm 배양용기에  $1 \times 10^5$  cell/mL씩 분주한 후 10% 우태혈청이 함유된 DMEM에서 2-3일간 배양후, 폴리에틸렌 마모편을 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL로 투여하고 배양 7, 14, 21일째 세포와 배양액을 분리하여 배양기간과 농도에 따른 변화를 분석하였다. 폴리에틸렌 마모편은 투여치 않은 군을 대조군으로 하였다. 세포 증식률은 각 군에서 분주 후 7, 14, 21일째 배양용기에서 세포를 분리한 후 혈구계로 세포수를 측정하였다.

### 4. Alkaline phosphatase 활성도 분석

배양 7, 14, 21일째에 각 배양용기에서 배양액을 버리고 인산 완충용액으로 세척하였다. 희석된 substrate solution (pH 9.8, p-nitrophenylphosphate, 2.5 mM) 1 mL를 첨가하여 15분간 37°C에서 반응시켰다. 1N NaOH 1 mL를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 반응물을 405 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하고 후 각 군의 측정값을 세포농도로 보정하였다.

### 5. 골결절 형성 분석(von Kossa 염색)

배양 7, 14, 21일째에 각 배양용기에서 10% neutral buffered formalin으로 15분간 고정시키고 증류수로 세척한 후 von Kossa 법(Sigma)을 이용하여 염색하였다. 골결절은 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 40배상에서 골결절의 수를 측정하였다.

### 6. 제1형 교원질에 대한 mRNA 분석(Northern blot analysis)

배양 7, 14, 21일째에 실험군과 대조군의 골아세포를 분리한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagene, Hilden, Germany)을 사용하여 total RNA를 분리하고, 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 각 군의 total RNA 6  $\mu\text{g}$ 을 취하여 전기영동 후  $20 \times \text{SSC}$  용액(3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0)에서 Nylon membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 상온에서 20시간 transfer하였다. UV cross linker (Hofer, San Francisco, CA, USA)에서 120,000  $\mu\text{J}$ 로 RNA를 membrane에 고정시키고 prehybridization시켰다.  $\beta$ -actin의 probe에 방사선 동위원소인 [<sup>32</sup>P]을 표시하기 위하여 *red*-Prime labeling kit (Amersham)을 이용하여 random primer labeling을 실시하였다. 제1형 교원질의 sense primer (5' CAA AGA AGG CGG CAA AGG TC 3'), antisense primer

(5' ACG ATC ACC ACT CTT GCC AG 3')로 미리 합성된 cDNA probe (1 ng/ $\mu$ L) 55  $\mu$ L를 Labelling kit로 47  $\mu$ L를 옮긴 후 잘 혼합하여 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham)을 첨가하고 37°C에서 1시간 방치하였다. 표지된 probe를 prehybridization 용액에 첨가하여 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 후 Nylon membrane을 X-ray 필름에 현상하였다.

### 7. Osteocalcin에 대한 mRNA 분석(RT-PCR)

배양 7, 14, 21일째에 실험군과 대조군의 골아세포를 분리한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen)을 사용하여 분리한 total RNA 2  $\mu$ g과 1  $\mu$ L의 random primer를 섞은 후, osteocalcin cDNA를 합성하였다. 합성된 첫 번째 가닥의 cDNA 용액 1  $\mu$ L에 10 pmole의 sense primer (5' CTG CTC ACT CTG CTG GCC CTG AC 3')와 10 pmole의 antisense primer (5' CGG TGG TGC CAT AGA TGC GCT TG 3')을 첨가한 후 중합효소 연쇄 반응액(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0)을 첨가하였다. 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)은 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 57°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 1분간의 합성과정을 30회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 8분간 합성반응을 시킨 후 반응액 중 5  $\mu$ L를 취하여 1.2% agarose gel에서 중합효소 연쇄반응 표지(PCR marker)와 같이 전기영동한 후 UV transilluminator하에 관찰 후 촬영하였다.  $\beta$ -actin도 sense primer (5' TTC TAC AAT GAG CTG CGT G 3'), antisense primer (5' CTT GAT CTT CAT GGT GCT 3')을 사용하여 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 60°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 40초간의 합성과정을 25회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 8분간 합성반응을 시킨 후 전기영동하여 density를 측정하고 osteocalcin mRNA의 density를 보정하였다.

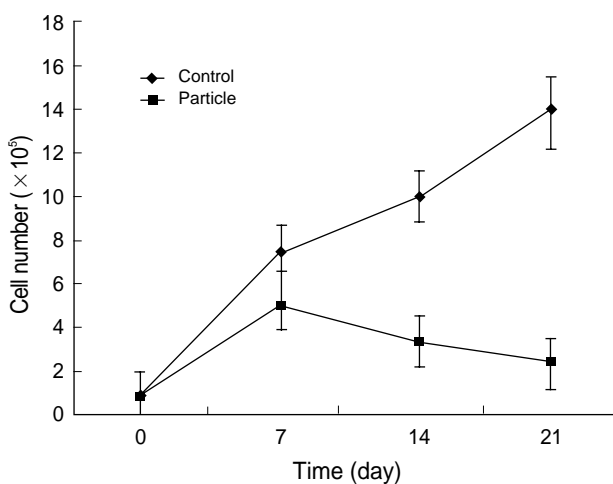


Fig. 2. Particle group induces a measurable drop in cell proliferation of rat osteoblasts at day 14 and day 21 of exposure. Data are the mean  $\pm$  SE. \* $p$ <0.05.

### 8. OPG와 RANKL에 대한 mRNA 분석(RT-PCR)

백서의 OPG (sense primer: 5' TCC CTT GCC CTG ACT ACT CTT AT 3', antisense: 5' GAA CCC ATC CGG ACA TCT TTT 3')와 RANKL (sense primer: 5' CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC AGT 3', antisense primer: 5' AAA GCC CCA AAG TAC GTC GCA TCT 3')의 RT-PCR은 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 57°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 1분간의 합성과정을 30회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 8분간 합성반응을 시킨 후 반응액 중 5  $\mu$ L를 취하여 1.2% agarose gel에서 중합효소 연쇄반응 표지(PCR marker)와 같이 전기영동하여 측정하였고, OPG와 RANKL mRNA의 density를 보정하였다.

### 9. 통계학적인 분석

통계학적 분석은 SAS 6.12 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 본 실험은 3회 이상 반복하여, 폴리에틸렌 마모편과 대조군간의 차이는 Mann-Whitney test를 이용하였으며, 폴리에틸렌 마모편의 농도에 따른 차이는 ANOVA test를 이용하여 분석하였다.검정시 유의수준은  $p$ 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 세포 증식률

실험군에서는 세포수가 배양 7일째  $5 \times 10^5$  ( $\pm 1.2 \times 10^5$ ) cell/mL로 정점을 이룬 후, 배양 14일째  $3 \times 10^5$  ( $\pm 0.9 \times 10^5$ ) cell/mL, 배양 21일째  $2 \times 10^5$  ( $\pm 0.8 \times 10^5$ ) cell/mL로 감소하였으나, 대조군에서는 배양 7일째  $7 \times 10^5$  ( $\pm 1.5 \times 10^5$ ) cell/mL, 배양 14일째  $10 \times 10^5$  ( $\pm 1.7 \times 10^5$ ) cell/mL, 배양 21일째  $14 \times 10^5$  ( $\pm 2.1 \times 10^5$ ) cell/mL로 지속적으로 증가하였다( $p$ <0.05) (Fig. 2).

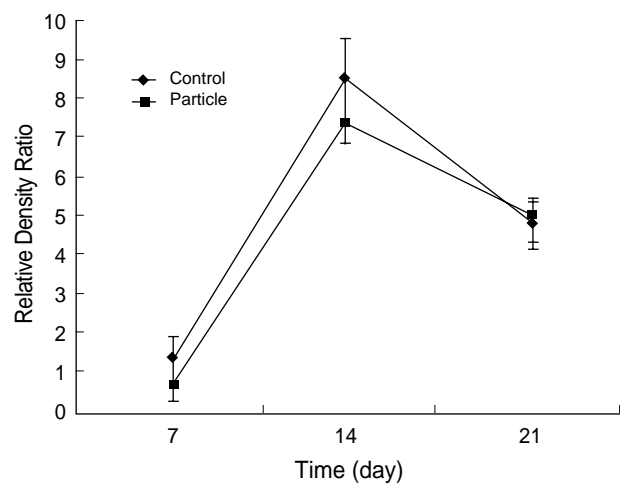


Fig. 3. Activity of alkaline phosphatase in particle group is lower than that of control group at day 7 and day 14 of exposure, but there is no significant difference. Data are the mean  $\pm$  SE.

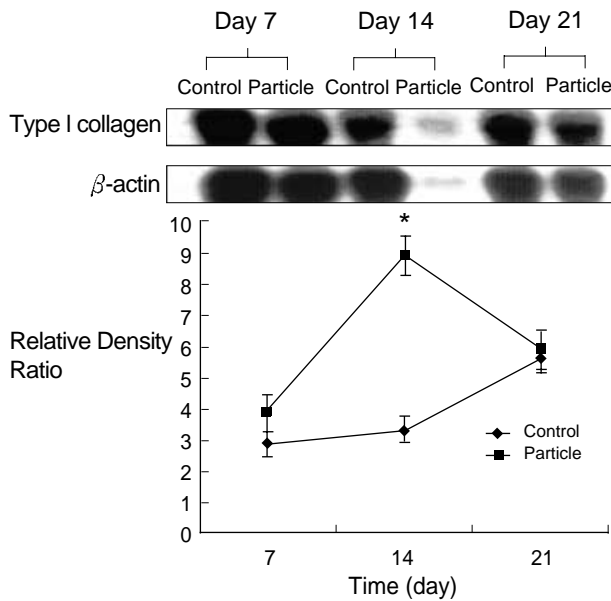


Fig. 4. Northern blot hybridization of type I procollagen mRNA in particle group shows early expression of type I procollagen mRNA at day 14. Data are the mean  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ .

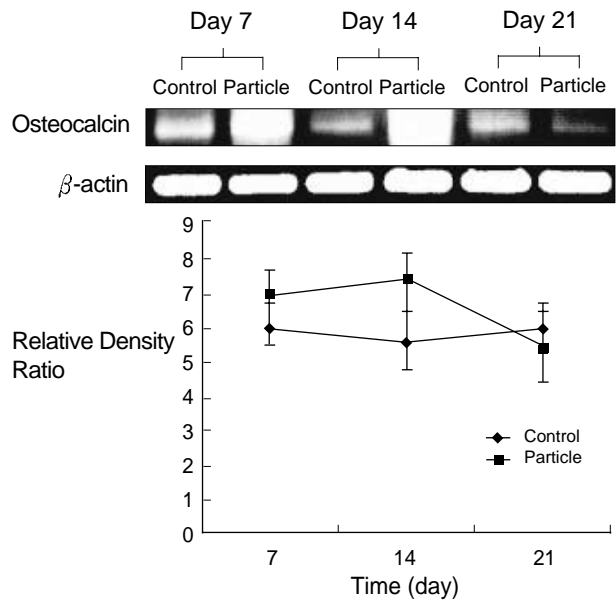


Fig. 5. Polymerase chain reaction analysis of osteocalcin mRNA is similar to expression pattern of type 1 collagen mRNA, but there is no significant difference between two groups. Data are the mean  $\pm$  SE.

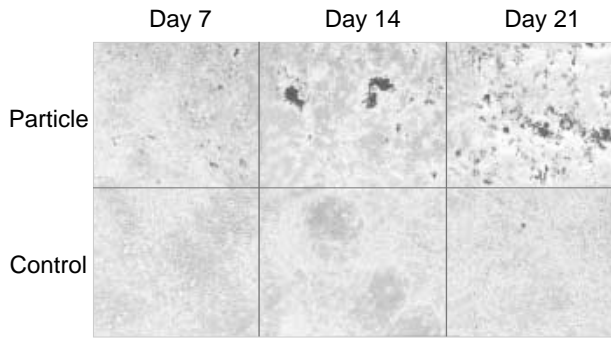


Fig. 6. von-Kossa stains show that bone nodules in particle group were noted earlier and more than that in control group.

**2. Alkaline phosphatase 활성도**

Alkaline phosphatase 활성도는 양군에서 증가하다가 14일째에 정점을 이루고 감소하였으며, 대조군에 비해 실험군에서 배양 7일째에  $54 \pm 8\%$ , 배양 14일째에  $85 \pm 10\%$ 로 낮았고, 배양 21일째에는  $101 \pm 6\%$ 로 높았으나 통계학적인 의미는 없었다( $p > 0.05$ ) (Fig. 3).

**3. 제1형 교원질 mRNA의 발현**

실험군에서는 대조군에 비해 배양 7일째에  $134 \pm 11\%$ , 배양 14일째에  $270 \pm 15\%$ , 배양 21일째에는  $105 \pm 9\%$ 로 높았으나, 배양 14일째에만 통계학적으로 의미있게 높았다( $p < 0.05$ ). 배양기간에 따른 제1형 교원질 mRNA 발현의 변화는 실험군에서 배양 14일째 정점을 이루고 감소하는 반면, 대조군에서는 지속적으로 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4).

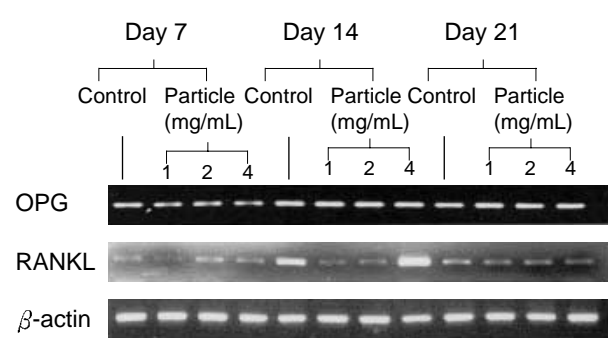


Fig. 7. Polymerase chain reaction analysis of OPG mRNA and RANKL mRNA in different doses of particles.

**4. Osteocalcin mRNA의 발현**

제1형 교원질 mRNA 발현과 비슷하게 실험군에서 14일째까지는 증가하였으나 이후로는 감소되었고, 대조군에서는 14일째부터 증가하였다(Fig. 5). 대조군에 비해 배양 7일째에  $117 \pm 9\%$ , 배양 14일째에  $133 \pm 10\%$ 로 높았고, 배양 21일째에는  $89 \pm 7\%$ 로 낮았으나 통계학적인 의미는 없었다( $p > 0.05$ ).

**5. 골결절 형성**

골결절의 형성은 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서 배양 7일째에  $15 \pm 2$ 개/HPF (high power field)로 관찰된 후, 배양 14일째에  $34 \pm 3$ 개/HPF, 배양 21일째에는  $59 \pm 5$ 개/HPF로 지속적으로 증가하였으나 대조군에서는 21일째에도 관찰되지 않았다(Fig. 6).

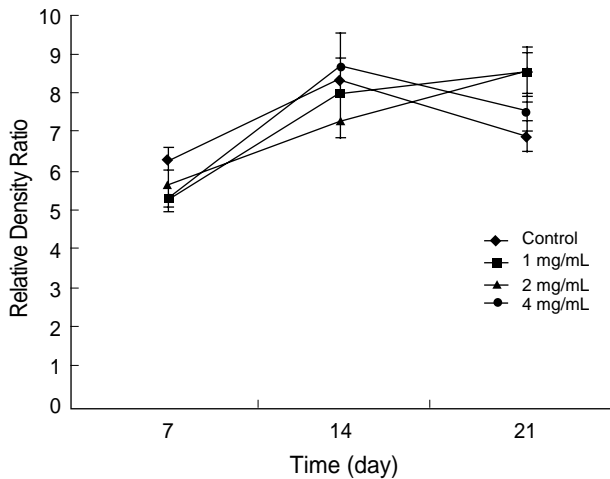


Fig. 8. The expression of OPG mRNA in particle group is similar to that of control group. Data are the mean  $\pm$  SE.

## 6. OPG와 RANKL mRNA의 발현

OPG mRNA의 발현은 1 mg/mL 농도의 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서는 대조군에 비해 배양 7일째에  $82 \pm 9\%$ , 배양 14일째에  $96 \pm 9\%$ 로 낮았고, 배양 21일째에는  $124 \pm 10\%$ 로 높았으나 통계학적인 의미는 없었다( $p > 0.05$ ). 2 mg/mL 농도의 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서도 배양 7일째에  $89 \pm 9\%$ , 배양 14일째에  $89 \pm 9\%$ 로 낮았고, 배양 21일째에는  $124 \pm 11\%$ 로 높았으나 통계학적인 의미는 없었다( $p > 0.05$ ). 4 mg/mL 농도의 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서도 배양 7일째에  $82 \pm 8\%$ 로 낮았고, 배양 14일째에  $102 \pm 9\%$ , 배양 21일째에는  $109 \pm 11\%$ 로 높았으나 역시 통계학적인 차이는 없었다( $p > 0.05$ ) (Fig. 7, 8). RANKL mRNA의 발현은 1 mg/mL 농도의 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서는 대조군에 비해 배양 7일째에  $74 \pm 7\%$ , 배양 14일째에  $51 \pm 6\%$ , 배양 21일째에는  $71 \pm 8\%$ 로 낮았으나 배양 14일째만 유의한 차이가 있었다( $p < 0.05$ ). 2 mg/mL 농도의 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서도 배양 7일째에  $101 \pm 9\%$ 로 높았고, 배양 14일째에  $53 \pm 8\%$ , 배양 21일째에는  $69 \pm 8\%$ 로 낮았으나 배양 14일째만 유의성이 있었다( $p < 0.05$ ). 4 mg/mL 농도의 폴리에틸렌 마모편을 투여한 군에서도 배양 7일째에  $87 \pm 8\%$ 로 낮았고, 배양 14일째에  $144 \pm 12\%$ 로 높았으며, 배양 21일째에는  $48 \pm 9\%$ 로 낮았으나, 배양 14일째에 유의성있게 높았다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7, 9).

## 고 찰

골용해와 무균성 해리를 보이는 조직에서 채취한 연부조직막의 조직학적 분석에 의하면 이물질 육아종 소견을 보이고 주로 마모편을 탐식한 대식세포와 섬유아세포가 분포한다<sup>5)</sup>. 이물반응에 의해 유도된 대식세포와 섬유아세포로부터 여러 가지 생물학적인 인자가 분비되는데, 명확히 밝혀지지는 않았지만 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> 등이 관여할 것으로 보고되고 있

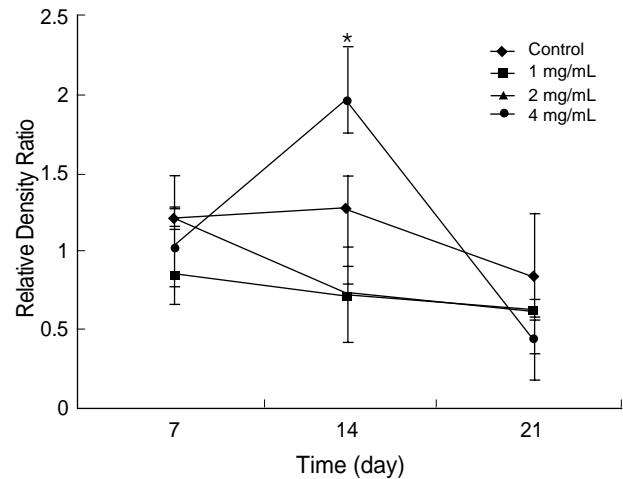


Fig. 9. The expression of RANKL mRNA was significantly increased in high concentration particle group (4 mg/mL) at day 14. Data are the mean  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$ .

다<sup>6,7,22,23)</sup>. 이와 같이 기존의 연구는 골흡수의 측면에서, 주로 대식세포와 파골세포, 섬유아세포에 집중되어졌다<sup>3-11)</sup>. 그러나 골의 재형성과정은 골소실과 골형성의 두가지 과정이 균형을 이루면서 일어나는 것으로 인공관절 전치환술 후 골용해에서도 대퇴삽입물 주위에 골흡수의 증가뿐만 아니라 골아세포에서의 골형성의 저하도 중요한 역할을 할 것으로 볼 수 있다<sup>12,14,20,21)</sup>. 본 연구 결과에 의하면 골아세포의 증식률이 대조군에 비해 폴리에틸렌 마모편을 첨가한 군에서 의미있게 감소하였고 alkaline phosphatase 활성도도 감소하였으나 통계학적 의미는 없었다. 반면에 제1형 교원질 mRNA 발현과 골결절의 형성은 증가되었는데, 폴리에틸렌 미세입자가 골아세포의 기질형성과 무기질화의 과정을 촉진하는 소견으로 볼 수 있다. 그러나 골아세포 배양에서 증식과 분화의 특징을 고려한다면 다른 해석을 유도할 수 있다. 즉 골아세포의 일차배양을 할 경우 증식기, 기질 성숙기, 무기질화과정의 3단계를 거치게 되며, 각 과정사이에는 경계가 있어 각 과정의 진행에 영향을 주고 있다. 35일간의 일차배양을 할 경우 첫 12일까지 세포 증식기에 해당되며, 이 시기에 세포 증식률이 높고, 기질형성에 필요한 제 1형 교원질, TGF, fibronectin의 생산으로 특징지어질 수 있다. 기질 성숙기는 증식기 이후 20일까지에 해당되며, DNA의 합성이 감소되며 기질의 구성의 변화과정을 거치며 alkaline phosphatase 표현의 증가가 특징적이다. 무기질화 과정은 마지막 단계로 무기질화 과정에 필요한 osteocalcin, osteopontin, calcium의 축적이 이루어진다<sup>20)</sup>. 본 연구의 결과를 이 과정에 적용시킨다면, 폴리에틸렌 마모편이 골아세포의 증식을 감소시켜, 기질 성숙과 무기질화과정을 조기에 유도한 것으로 볼 수 있다. 반면에 대조군에서는 지속적인 골아세포의 증식이 관찰되었으며 충분한 시간에 걸쳐 기질 성숙과 무기질화과정을 유도하는 것으로 판단된다. 이러한 점은 배양 21일째 제1형 교원질과 osteocalcin의 mRNA의 발현이 역전되는 소견이 뒷받침하고 있다. 즉 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 직접적으로 작

용하여, 충분한 골아세포의 증식을 억제하고 골아세포의 분화과정을 조기에 유도하는 것으로 판단되었다. 이는 사람의 골아세포양 세포를 사용하여 시험한 보고와 일치되는 결과이다<sup>17)</sup>.

본 연구에서 골아세포의 증식과 분화과정에서 폴리에틸렌 마모편의 직접적인 영향 외에도 골아세포와 파골세포의 상호작용에 중요한 역할을 하는 인자에 대해서도 분석하였다. RANKL은 TNF ligand 계열로 RANK에 작용하여 파골세포의 형성과 활성도를 증가시키는 것으로 알려져 있고, OPG는 RANK와 유사한 용해성 수용체로 RANKL에 강한 친화성을 가지고 있어 RANK와의 작용을 억제하는 osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)로 알려져 있다<sup>4,8,13,16,17,21)</sup>. 따라서 골흡수 과정은 OPG와 RANKL의 균형을 통해 조절될 수 있고, 골아세포에 마모편이 작용하여 이들 인자들의 발현에 미치는 영향을 규명함으로써 골아세포를 통한 파골세포 분화 및 활성도의 조절기전을 규명할 수 있다. 본 연구의 결과에 의하면 OPG mRNA의 발현은 대조군이나 폴리에틸렌 마모편의 농도에 따라 의미있는 차이는 없었다. 그러나 RANKL mRNA의 발현은 저농도(1, 2 mg/mL)에서는 대조군보다 감소하였으나, 고농도(4 mg/mL)에서 오히려 대조군보다 증가하였다. 이는 폴리에틸렌 마모편이 OPG의 발현에는 영향을 미치지 않으나 일정한 농도 이상에서는 RANKL의 발현을 촉진하므로써 파골세포를 활성화하는 것으로 사료되며 폴리에틸렌 마모편의 농도와 골용해의 발생관계는 밀접한 관련이 있음은 이미 보고된 바 있어 본 실험의 결과와 일관성이 있다<sup>19)</sup>. 그러나 저농도의 폴리에틸렌 마모편이 배양 14일째에 대조군보다 RANKL의 발현을 감소시킨 점과 폴리에틸렌 마모편이 OPG의 발현에는 영향을 미치지 않은 점은 향후 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 사용된 폴리에틸렌 마모편보다 더 높은 농도에서는 OPG와 RANKL 발현에 어떠한 영향을 주는지도 더 연구해야 할 과제로 남아 있다. 골용해의 복잡한 발생기전을 본 연구의 결과로만 해석할 수는 없지만, 대식세포, 파골세포와 이들 사이에 작용하는 인자들의 연구에서 탈피하여 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 직접적인 영향을 미쳤다는 점과 골아세포-파골세포사이의 상호관계를 일부 규명하였다는 점에서 추후 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 결론

폴리에틸렌 마모편은 골아세포의 증식은 감소시켜, 골아세포의 골형성에 필요한 효소나 기질의 형성을 조기에 유도함으로써 골형성을 억제하였고, 파골세포에 영향을 미치는 RANKL의 발현을 촉진하여 파골세포의 활성을 유도하는 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

- Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop H, Schmalzried TP and Amstutz HC: Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res*, 29: 127-131, 1995.
- Campbell P, Ma S, Yeom B, Schmalzried TP and Amstutz HC: Tissue digestion for wear debris particles isolation. *J Biomed Mater Res*, 28: 523-526, 1994.
- Han CD and Lee WS: The effect of polyethylene particles on MG63 osteoblastlike cells. *J Korean Orthop Res Soc*, 2: 77-85, 1999.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 140: 4382-4389, 1999.
- Jiranek WA, Machado M, Jasty M, et al: Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. *J Bone Joint Surg*, 75-A: 863-879, 1993.
- Kadoya Y, Revell PA, Al-Saffar N, Kobayashi A, Scott G and Freeman MAR: Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties: Histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. *J Ortho Research*, 14: 473-482, 1996.
- Kim KJ, Hashimoto J, Morita H, Sato K and Kashiwazaki S: Effects of implant particles on the production of IL-1 and IL-6 by bone marrow cells. *Trans Orthop Res Soc*, 17: 341, 1992.
- Lee S and Lorenzo JA: Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: Correlation with osteoclastlike cell formation. *Endocrinology*, 140: 3552-3561, 1999.
- Maloney WJ and Smith RL: Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: The role of particulate wear debris. *ICL*, 45: 171-182, 1996.
- Maloney WJ, Smith RL, Schmalzried TP, Chiba J, Huene D and Rubash H: Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg*, 77-A: 1301-1310, 1995.
- Manlapaz M, Maloney WJ and Smith RL: In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. *J Ortho Research*, 14: 465-472, 1996.
- Martinez ME, Medina S, del Campo MT, Garcia JA, Rodrigo A and Munuera L: Effect of polyethylene particles on human osteoblast cell growth. *Biomaterials*, 19: 183-187, 1998.
- Neale SD, Fujikawa Y, Sabokbar A, et al: Human bone-derived cells support formation of human osteoblasts from arthroplasty-derived cells in vitro. *J Bone Joint Surg*, 82-B: 892-900, 2000.
- Pollice PF, Silverton SF and Horowitz SM: Polymethylmethacrylate-stimulated macrophages increase rat osteoblast precursor recruitment through their effect on osteoblasts in vitro. *J Ortho Research*, 13: 325-334, 1995.
- Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW and Athanasou NA: Human arthroplasty derived macrophages differentiate in osteoclastic bone resorbing cells. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56: 414-420, 1997.

1. Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop H, Schmalzried TP and Amstutz HC: Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res*, 29: 127-131,

16. **Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, et al:** Expression of osteoprotegerin (osteoclasto-genesis inhibitory factor) in culture of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*, 14: 1486-1492, 1999.
17. **Schwarz EM, O'Keefe RJ and Regis J:** Breakthrough in bone: the molecular mechanism of osteoblast/osteoclast coupling revealed. *Curr Opin Orthop*, 11: 329-335, 2000.
18. **Shanbhag AS, Hasselman CT and Rubash HE:** Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *J Ortho Research*, 14: 1000-1004, 1996.
19. **Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO and Glant TT:** Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. *Clin Orthop*, 342: 205-217, 1997.
20. **Stein GS, Lian JB and Owen TA:** Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*, 4: 3111-3123, 1990.
21. **Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, et al:** Involvement of receptor activator of nuclear factor [kappa]B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 259-269, 2000.
22. **Xu JW, Kontinen YT, Lassus J, et al:** Tumor necrosis factor-alpha in loosening of total hip replacement. *Clinical&Experimental Rheumatology*, 14: 643-648, 1996.
23. **Yokohama Y, Matsumoto T, Hirakawa M, et al:** Production of matrix metalloproteinases at the bone-implant interface in loose total hip replacements. *Lab Invest*, 73: 899-911, 1995.