골용해의 발생기전에서 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 우 석

골용해의 발생기전에서 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 미치는 영향

지도교수 강 응 식

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001 년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
이 우 석

이우석의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

논문을 작성하기까지 자상한 지도와 격려로 이끌어 주신 강응식 교수님과 한창동 교수님께 심심한 감사를 드립니다. 논문 심사 중 수고로움을 아끼지 않고 훌륭한 지도 편달을 마다하지 않으신 김성재 교수님, 연동수 교수님, 박종철 교수님께도 진심으로 감사 드립니다. 또한 논문을 완성하기까지 격려와 성원을 보내 주신 연세대학교 정형외과 교수님들과 건양대학교 정형외과 교수님들에게 감사의 마음을 드리며, 연구를 위해 도와주신 강은정 선생님, 안미선 선생님께도 감사드립니다.

오늘이 있기까지 무한한 사랑으로 돌보아주신 부모님과 물심 양면으로 지원해 주신 장인어른신과 장모님께 감사드립니다. 착하고 사랑스런 아내와 귀여운 경은, 일홍이와 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저자 씀

목 차

그 림 목 차

국문요약

골용해의 발생기전에서 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 미치는 영향

골용해는 인공관절수술 후 인공관절의 수명을 감소시키는 주된 합병증이다. 골용해의 발생기전은 복잡하며 아직까지 완전하게 알려지지 않았으나, 인공관절의 마모로 발생한 마모편이 비만세포나 대식세포에 의해 탐식되면, 이들 세포에서 분비된 매개인자에 의해 활성화된 파골세포가 골흡수를 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러나 마모편이 골아세포에는 어떠한 영향을 미치는지 알려진 바가 적으며, 정상조직에서는 밀접한 상호작용을 가지고 있는 골아세포와 파골세포가 골용해 조직에서는 어떠한 상호작용에 의해 골형성에 비해 골흡수를 촉진하는지도 잘 모르고 있다. 본 연구에서는 생후 1일된 백서의 두개골에서 분리한 골아세포를 일차배양하면서, 인공관절 재치환술시 채취한 Ultra-high molecular weight polyethylene(UHMWPE) 마모편을 투여하고, 배양 7일, 14일, 21일째 세포 증식율, alkaline phosphatase 활성도, 제1형 교원질 mRNA 발현, osteocalcin mRNA 발현, 골결절 형성, osteoprotegerin(OPG) mRNA 발현, osteoclast differentiation factor(ODF) mRNA 발현 등을 측정하여 골용해의 발생기전에서 골아세포의 역할을 규명하고자 하였다.

배양시기별 세포수는 혈구계로 측정하였고, alkaline phosphatase 활성도는 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 제1형 교원질 mRNA 발현은 Northern blot법으로, osteocalcin mRNA, OPG mRNA, ODF mRNA 발현은 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)법으로 분석하였으며, 골결절의 형성정도는 von Kossa 방법을 이용하여 측정하였다.

세포수는 UHMWPE 마모편을 투여한 군과 대조군에서 배양 7일째까지 모두 증가하였으나, 이후로는 UHMWPE 마모편을 투여한 군에서 대조군에 비해 의미있게 감소하였다. alkaline phosphatase 활성도는 양군간에 의미있는 차이를 보이지 않았고, 제1형 교원질 mRNA의 발현은 배양 14일째에 대조군에 비해 의미있게 증가하였으나 21일째에는 차이가 없었다. osteocalcin mRNA의 발현도 제1형 교원질의 발현과 유사한 소견을 보였으나 통계학적인 차이는 없었다. 골결절은 UHMWPE 마모편 투여군에서 배양 7일째부터 나타나 배양기간에 따라 증가하는 소견을 보였으나, 대조군에서는 관찰되지 않았다. OPG mRNA의 발현은 양군에서 차이가 없었고 마모편 농도에 따른 변화도 없었으나, ODF mRNA의 발현은 고농도(4 mg/ml)의 마모편 투여군에서 증가하였다.

결론적으로 UHMWPE 마모편은 백서의 골아세포의 증식을 억제하여 조기에 세포외 기질성숙과 무기질화 과정을 유도한 것으로 추정되며, 파골세포의 활성을 촉진하는 ODF의 발현을 증가시켰다. 따라서 골용해에서 UHMWPE 마모편은 직접적으로 골아세포의 증식에 영향을 미칠 뿐만 아니라 간접적으로 파골세포의 활성을 촉진하여, 골 재형성과정에 불균형을 초래하는 것으로 사료된다.

핵심 되는 말 : 골용해, UHMWPE 마모편, 골아세포, 성장, 분화, osteoprotegerin, osteoclast differentiation factor

골용해의 발생기전에서 폴리에틸렌 마모편이 골아세포에 미치는 영향

<지도 강 응 식 교수>
연세대학교 대학원
의과학사업단
이 우 석

I. 서 론

인공관절 전치환술(total joint replacement)은 대퇴골두 무혈성 괴사증, 말기 골관절염 등 관절의 심각한 병변에서 시행하는 재건술로 정형외과 영역에서 널리 시술되고 있다. 그러나 인공삽입물 주위에 발생하는 무균성 해리(aseptic loosening)나 골용해(osteolysis)는 인공관절 전치환술 후 생기는 중요한 합병증으로 인공삽입물의 수명을 단축시키고 재치환술을 증가시켜 환자의 사회적 활동의 제한과 경제적 부담을 주고 있다[1]. 수술자의 입장에서도 심각한 골소실로 재수술시 어려움을 겪게 되고, 수술 후 결과도 초기 수술시 보다 만족스럽지 못하여 치료에 많은 어려움을 주고 있다.[1]

골용해는 인공관절의 마모로 인공관절주위로 유리된 마모편(wear debris)에 대한 생물학적 반응으로 보고되고 있다.[2,3] 즉, 인공관절의 마모로 인한 polymethylmetacrylate(PMMA), ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE), 금속 마모편(metal debris) 등의 마모편이 인공관절주위 조직에 노출되면 대식세포(macrophages)에 포식되고, 대식세포는 interleukin-1

(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), platelet-derived growth factor(PDGF) 등을 분비하여 다른 대식세포를 모으고, 섬유아세포(fibroblast)를 자극하여 prostagladin E2(PGE2)의 분비를 증가시킨다. 이러한 인자들은 파골세포(osteoclast)의 증식과 다핵세포로의 융합을 촉진시켜 골소실을 유발하게 된다[2-6]. 또한 matrix metalloproteinase(MMP)와 같은 교원질 분해효소의 분비를 촉진시켜 결체조직의 단계적 분해를 유발한다.[7] 골용해를 보이는 조직에서 채취한 연부조직막의 조직학적 분석에 의하면 이물질 육아종(foreign body granuloma) 소견을 보이며 주로 대식세포와 섬유아세포가 분포하는 것으로 보아 이점을 뒷받침하고 있다.[8] 따라서 대부분의 연구가 대식세포, 섬유아세포, 파골세포 등과 이들 세포에서 분비되는 매개인자(cytokines)에 집중되어져 왔다.[3-11] 그러나 골의 재형성과정(bone remodeling)은 골소실과 골형성의 두가지 과정이 균형을 이루면서 일어나는 것으로, 인공관절 전치환술 후 골용해는 대퇴삽입물 주위에 골흡수의 증가뿐만 아니라 골아세포에서의 신생골 형성 저하에 의한 골재형성의 실패도 크게 기여할 것으로 볼 수 있다.[12-15] Wang 등에 의하면 사람의 골아세포양 세포(osteoblastlike cell)를 시험관내에서 배양하여 인공관절의 금속에서 분리된 마모편(titanium, cobalt, chromium)을 투여하였을 때, 골아세포의 osteocalcin의 분비와 제1형 교원질(type Ⅰ collagen)의 형성을 억제한다고 보고한 바 있어 골용해의 작용기전 중에서 골아세포의 역할에 대한 관심이 집중되고 있다.[15]

최근에는 골아세포에서 생성되어 파골세포의 분화에 관여하는 새로운 인자들이 발견되었는데, osteoclast differentiation factor(ODF)는 TNF ligand 계열로 osteoclast differentiation and activation receptor(ODAR)에 작용하여 파골세포의 형성과 활성도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 osteoprotegerin(OPG)라는 단백질은 ODF 수용체와 유사한 용해성 수용체로 ODF에 강한 친화성을 가지고 있어 ODF와 ODF 수용체와의 작용을 억제하

는 osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF)로 알려져 있어, 골흡수 과정은 OPG와 ODF의 균형을 통해 조절될 수 있다.[16-23] OPG와 ODF는 골아세포에서도 형성되므로, 골아세포에 마모편이 작용하여 이들 인자들의 발현에 미치는 영향을 규명함으로써 골아세포를 통한 파골세포 분화 촉진의 작용기전을 규명할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 백서의 골아세포를 배양하면서 UHMWPE 마모편에 노출시켜, 골아세포의 증식과 분화에 미치는 영향과 파골세포의 활성도를 조절하는 OPG와 ODF의 발현정도를 분석하므로 골아세포를 통한 골용해의 작용기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. UHMWPE 마모편의 분리 및 정량

골용해로 인해 인공고관절 재치환술을 시행한 환자의 골용해부위에서 조직을 채취하여 수술용 칼을 이용하여 3 x 3 mm 크기로 잘라냈다. 조직의 효소처리를 위하여 papain(Sigma, St Louis, MO, USA) 100 μl, *N*-acetylcysteine(Sigma) 3.25 mg, 증류수 9 ml, phosphate buffer (Na_2HPO_4 3.55 g + NaH_2PO_4 3.45 g + 증류수 100 ml, pH 6.5)를 혼합하여 papain 용액을 만들었다. 잘게 자른 조직에 papain 용액을 첨가하여 65℃에서 24시간 동안 소화시킨 후 용액 5 ml을 5%, 10%, 20%, 50% sucrose (Sigma)로 구성된 6 ml 용액에 첨가하고, Ultracentrifuge(Optima™ XL- 100K, Beckman Instruments, PALO ALTO, CA, USA)의 SW41 Ti rotor을 0℃, 40000 rpm(285,000 x g)에서 3시간 동안 사용하여 초원심 분리하고 최상층에 모인 UHMWPE 마모편을 분리하였다(그림 1).[24,25] 분리된 UHMWPE 마모편은 10 ml 증류수와 혼합하여 60℃에서 1시간 동안 세척하고 98% ethanol에 보관하였으며, 분리과정은 무균적인 조작으로 시행하였다. 상기 방법으로 분리된 UHMWPE 마모편은 0.2 μm의 polycarbonate filter에 여과시켜 건조시킨 후 주사 전자 현미경(Hitachi H-500, Tokyo, Japan)을 이용하여 UHMWPE 마모편의 크기 및 형태를 확인하였다(그림 2).[26,27] 분리된 UHMWPE 마모편의 크기는 평균 0.4(0.1～1.4) μm이었으며, 92% 이상이 1 μm 이하였다. 형태는 섬유형이 1%, 구형이 99%로 대부분이 구형이었다. 골용해조직 1 gm당 분리된 UHMWPE 마모편의 수는 5.6×10^8 (2.2×10^6～1.2×10^9)개 이었다. 일부(10 mg)는 진공 건조시킨 후 electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA, Quantum 2000, PEI, MN, USA)를 이용하여, 분리된 UHMWPE

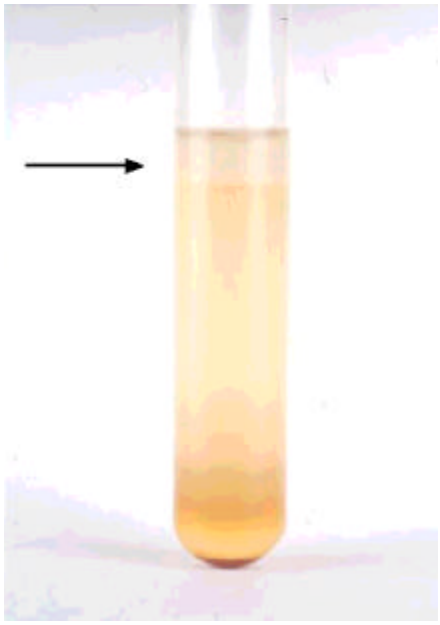


그림 1. UHMWPE **마모편의 분리**. Papain**으로 용해된 조직을** 5%, 10%, 20%, 50% sucrose **용액에서 초원심분리하여 최상층(화살표)에서** UHMWPE **마모편을 분리하였다**.

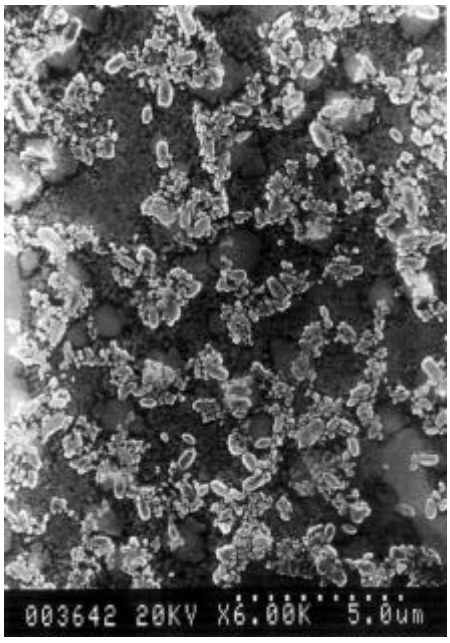
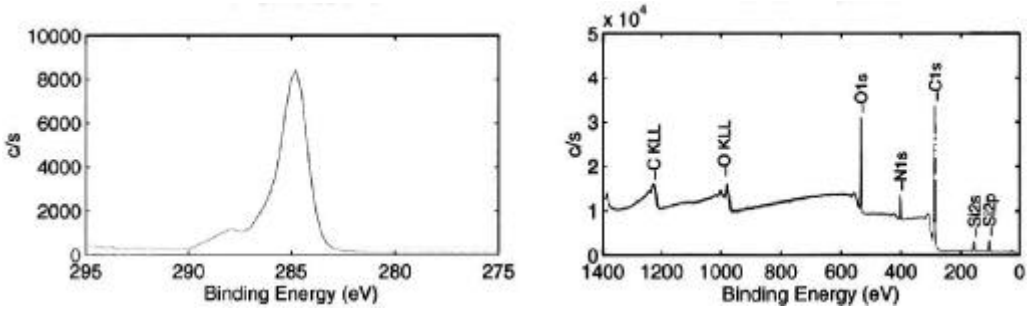


그림 2. **분리된** UHMWPE **마모편의 주사전자 현미경 소견**. 99% **이상이 구형이며, 크기는 평균** 0.4(0.1～1.4) μm **이었다**.

마모편의 화학적 성분을 확인하였다. 표면 구성요소를 분석하는 저해상도 개관주사(survey scan, 187.9 eV)상 C-H 결합에 해당되는 285.0 eV에서 정점(peak)을 이루었으며, C-O 결합에 해당되는 287.7 eV에서 작은 정점을 이루어진 것으로 볼 때, UHMWPE 마모편이 체내에서 일부 산화(oxidation)된 것으로 판단되었다(그림 3-A). 고해상도 C1s spectra(22.6 eV)상에서는 O1s, N1s, silicon 등의 정점이 관찰되었으나, 금속마모편은 관찰되지 않았다(그림 3-B).[26,27] 나머지 98% ethanol속에서 보관되었던 UHMWPE 마모편은 ethanol을 증발시킨 후 Dulbecco's modified essential medium(DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)속에 첨가하여 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml, 4.0 mg/ml의 농도가 되도록 배양액을 준비하였다.



A **B**

그림 3. 분리된 UHMWPE 마모편의 electron spectroscopy for chemical analysis. UHMWPE을 확인할 수 있었으며, 금속은 검출되지 않았다. A. 저해상도 개관주사, B. 고해상도 C1s spectra.

2. 골아세포의 분리 및 배양

생후 1일 이내의 Sprague-Dawley계 쥐의 두개골에서 골막과 봉합부위가

포함되지 않도록 골을 채취하였다. 채취한 조직을 인산완충용액으로 3회 세척을 실시한 다음 가위를 이용하여 1 mm 크기로 잘게 자르고, 잘린 시료를 미리 만들어 놓은 효소용액(collagenase 2 mg/ml, DNase I 0.1 mg/ml)에 넣고 금속봉으로 천천히 흔들면서 37°C 배양기에서 20분간 소화시켰다. 처음 상층액은 버리고 다시 효소용액에서 다시 40분간 소화시키고, 다시 상층액을 버리고 효소용액에 다시 넣어 90분간 소화시켰다. 이후 원심분리를 실시하여 상층액을 버리고 모아진 세포를 10% 우태혈청, penicillin과 streptomycin(100 U/ml, Gibco BRL)이 함유된 low glucose Dulbecco's modified essential medium(DMEM)으로 75 cm^2 배양용기에 넣어 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양을 실시하였다. 배지는 2일에 한 번 교환하였으며 실험에 사용 후 남은 세포는 -70°C에서 보관하였다. 골아세포의 표현형 확인은 골아세포의 배양 중 일부를 β-glycerophosphate를 첨가하여 골결절(bone nodule)이 형성되는 모습을 확인하였다.

3. 실험군 및 세포 증식율(cell proliferation) 측정

일차 배양된 골아세포를 0.25% trypsin-EDTA(Gibco BRL)로 처리하여 배양용기에서 세포를 분리한 후 혈구계(hemocytometer)로 세포수를 측정한 다음 100 mm 배양용기에 $1x10^5$ cell/ml씩 분주한 후 10% 우태혈청(Sigma)이 함유된 DMEM에서 2-3 일간 배양하여 세포를 안정화시켰다. UHMWPE 마모편을 1.0 mg/ml을 투여하고 배양 7, 14, 21일째 세포와 배양액을 분리하였다. UHMWPE 마모편은 투여치 않은 군을 대조군으로 하였다. 각각의 분리된 세포와 배양액에서 세포수, alkaline phosphatase 활성도, 제1형 교원질과 osteocalcin mRNA, 골결절 형성을 측정하였다. ODF와 OPG mRNA 발현은 UHMWPE 마모편의 농도를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml, 4.0 mg/ml로 달리하여

배양기간과 농도에 따른 변화를 분석하였다. 세포 증식율 분석은 각 군에서 분주 후 7, 14, 21일째에 0.25% trypsin-EDTA(Gibco BRL)로 처리하여 배양용기에서 세포를 분리한 후 혈구계로 세포수를 측정하였다.

4. Alkaline phosphatase 활성도 분석

배양 7, 14, 21일째에 각 배양용기에서 배양액을 버리고 인산완충용액로 세척하였다. 희석된 substrate solution(pH 9.8, p-nitrophenylphosphate, 2.5 m*M*) 1 ml를 첨가하여 15분간 37℃에서 반응시켰다. 1*N* NaOH 1 ml를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 반응물을 405 nm에서 분광광도계로 각 군에서의 흡광도를 측정한 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 Kossa법(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)를 사용하여 total RNA를 분리하고, 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 각 군의 total RNA 6 μg을 취하여 10x FGRB 2.5 μl, formaldehyde 4 μl, formamide 12.5 μl를 첨가하고 65°C에서 5분간 처리한 후 얼음에 식히고 완충용액(50% glycerol, 0.1 mg/ml bromophenol blue)을 2.5 μl를 첨가하여

1% formaldehyde agarose gel의 well에 투여하였다. 1x FGRB에서 100 Volt의 전압으로 2시간 동안 전기영동 후 20x SSC 용액(3 *M* Nacl, 0.3 *M* sodium citrate, pH 7.0)에서 Nylon membrane(Amersham, Buckinhamshire, UK)으로 상온에서 20시간 transfer하였다. Nylon membrane을 gel로 부터 제거하고 상온에서 1시간이상 건조시킨 후 UV cross linker(Hoefer, San Francisco, CA, USA)에서 120,000 μJ로 RNA를 membrane에 고정시켰다. nylon membrane을 42°C로 유지한 prehybridization 용액[5x SSC, 50% formamide, 5x Denhardt's 용액, 100 μg/ml, 0.1% SDS]에 넣고 30분간 prehybridization시켰다. β-actin의 probe에 방사선 동위원소인 [^{32}P]를 표시하기 위하여 *redi*-Prime labeling kit(Amersham)를 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/μl) 55 μl를 100°C에서 5분간 끓인 후 얼음물에서 1분간 냉각시키고 Labelling kit로 47 μl를 옮긴 후 잘 혼합하여 [α-^{32}P]dCTP(Amersham)를 첨가하고 37°C에서 1시간 방치하였다. 0.5 *M* EDTA를 1 μl를 첨가하여 반응을 중지시키고 100°C에서 5분간 끓인 후 즉시 얼음물에 냉각시켰다. 표지된 probe를 prehybridization 용액에 첨가하여 20시간 동안 42°C에서 hybridization을 실시하였다. Hybridization이 끝난 후 nylon membrane을 2x SSC, 0.1% SDS 용액으로 10분씩 상온에서 3회 세척을 실시하고, 0.2x SSC, 0.1% SDS 용액으로 68°C에서 10분씩 3회 세척을 실시하였다. Nylon membrane을 BAS-2500 phosphoimager(Fuji, Tokyo, Japan)를 이용하여 방사능을 측정하였으며, 이후 X-ray 필름에 -70°C에서 24시간 노출시켜 현상하였다.

7. Osteocalcin에 대한 mRNA 분석(RT-PCR)

배양 7, 14, 21일째에 실험군과 대조군의 골아세포를 분리한 후 RNeasy Mini Kit(Qiagene)를 사용하여 total RNA를 분리하고, 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. total RNA 2 μg 및 1 μl의 random primer를 섞은 후, 증류수를 이용하여 12 μl가 되도록 한 다음 70℃에서 10분간 가온하였다. 가온 후 얼음물에 담가 식히고 상온에서 10분간 유지한 후, 4 μl의 4x 반응완충용액, 2 μl의 0.1 *M* DTT, 1 μl의 10 m*M* dNTP 혼합물을 썩은 후 42℃에서 2분간 가온하였다. 200 U(1 μ)의 Superscript™ II (Gilbco BRL)을 첨가하여 42℃에서 50분간 반응시킨 후 2 U의 *E. coli* RNase H를 첨가한 후 37℃에서 20분간 반응시켜 template로 사용되었던 RNA를 분해하여 중합반응에 사용되지 않은 primer와 dNTP를 제거하여 osteocalcin cDNA를 합성하였다. 합성된 첫 번째 가닥의 cDNA 용액 1 μl에 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')를 첨가한 후 1 U의 Taq polymerase(Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)가 함유된 중합효소 연쇄 반응액(50 m*M* KCl, 10 m*M* Tris-HCl, pH 9.0)을 첨가하여 최종부피가 50 μl가 되게 하고 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응의 94℃에서 5분간 변성, 94℃에서 30초 동안 변성, 57℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 1분간의 합성과정을 30회 반복하였다. 최종으로 72℃에서 8분간 합성반응을 시킨 후 반응액 중 5 μl를 취하여 QIAquick PCR purification kit를 사용하여 중합반응에 사용되지 않은 primer와 dNTP를 제거하고 얻어진 중합효소 연쇄반응 산물은 1.2% agarose gel에서 중합효소 연쇄반응 표지(PCR marker)와 같이 전기영동한 후 UV transilluminator하에 관찰 후 촬영하였다.

β-actin도 sense primer(5' TTC TAC AAT GAG CTG CGT G 3'),

antisense primer(5' CTT GAT CTT CAT GGT GCT 3')를 사용하여 osteocalcin과 동일한 방법으로 RT-PCR(역전사-중합효소 연쇄반응)을 시행하였다.

8. OPG와 ODF에 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 ODF (sense primer: 5' CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC AGT 3', antisense primer : 5' AAA GCC CCA AAG TAC GTC GCA TCT 3')도 역시 osteocalcin과 동일한 방법으로 RT-PCR을 시행하였다.

9. 통계학적 분석

통계학적 분석은 SAS 6.12(SAS institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. UHMWPE 마모편과 대조군간의 차이는 Mann-Whitney test를 이용하였으며, UHMWPE 마모편의 농도에 따른 차이는 ANOVA test를 이용하여 분석하였다. 검정시 유의수준은 p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포 증식율

배양용기에 $1x10^5$ cell/ml**의 골아세포를 분주한 후** UHMWPE **마모편을 넣어 준 군에서는 세포수가 배양** 7**일째** $5x10^5(\pm 1.2x10^5)$ cell/ml**로 정점을 이룬 후, 배양** 14**일째** $3x10^5(\pm 0.9x10^5)$ cell/ml, **배양** 21**일째** $2x10^5(\pm 0.8x10^5)$ cell/ml**로 감소하였으나, 대조군에서는 배양** 7**일째** $7x10^5(\pm 1.5x10^5)$ cell/ml, **배양** 14**일째** $10x10^5(\pm 1.7x10^5)$ cell/ml, **배양** 21**일째** $14x10^5(\pm 2.1x10^5)$ cell/ml**로 지속적으로 증가하였다**. **즉, 세포증식은 배양** 7**일째까지 양군에서 모두 증가하였으나, 배양** 14**일째부터는** UHMWPE **마모편을 넣어 준 군에서는 감소하였고, 대조군에서는 지속적으로 증가하였다**($p<0.05$)(**그림** 4).

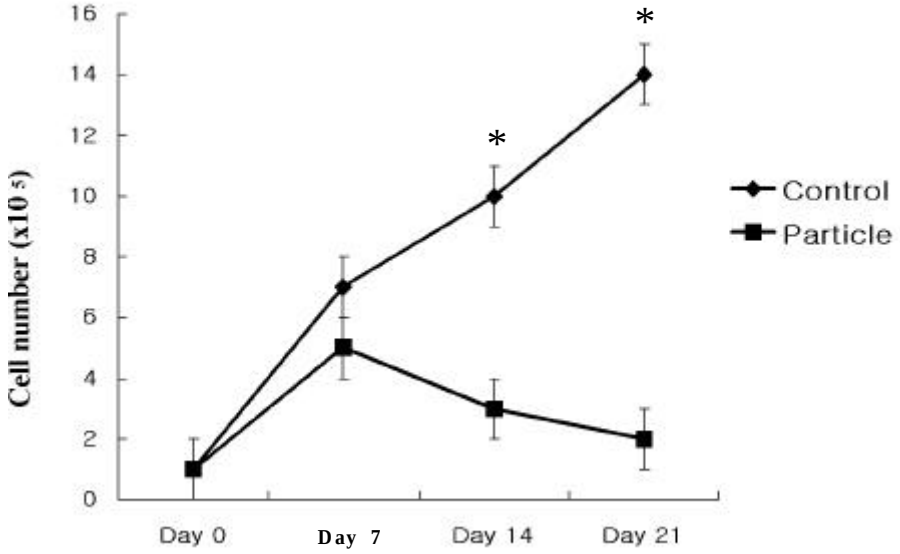


그림 4. **세포증식율. 배양** 7**일째까지 양군에서 증가하였으나, 이후로는** UHMWPE **마모편을 투여한 군이 대조군에 비해 감소하였다**(*: $p<0.05$).

2. Alkaline phosphatase 활성도

alkaline phosphatase 활성도는 양군에서 증가하다가 14일째에 정점을 이루고 감소하였으며, 대조군에 비해 UHMWPE 마모편을 넣어 준 군에서 배양 7일째에 54±8%, 배양 14일째에 85±10%로 낮았고, 배양 21일째에는 101±6%로 높았으나 통계학적인 의미는 없었다($p>0.05$)(그림 5).

3. 제1형 교원질 mRNA의 발현

제1형 교원질 mRNA 발현은 UHMWPE 마모편을 투여한 군에서는 대조군에 비해 배양 7일째에 134±11%, 배양 14일째에 270±15%, 배양 21일째에는 105±9%로 높았으나, 배양 14일째에만 통계학적으로 의미있게 높았다($p<0.05$). 배양기간에 따른 제1형 교원질 mRNA 발현의 변화는 UHMWPE

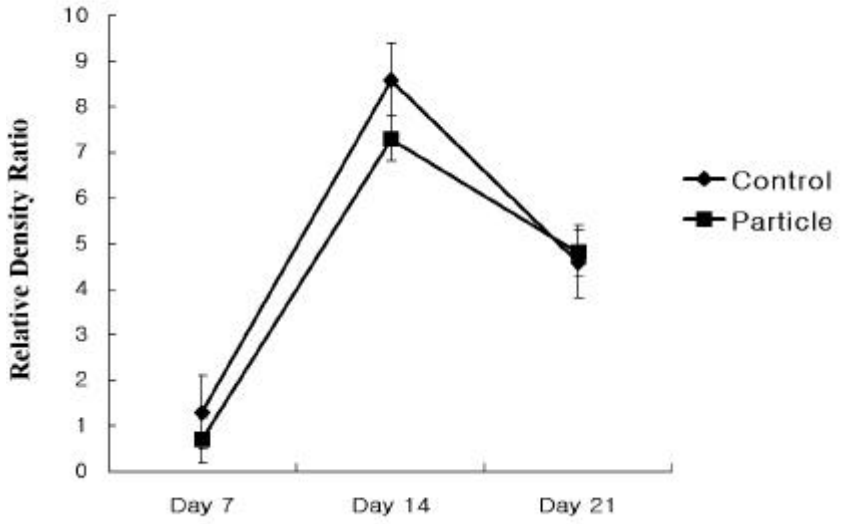


그림 5. 배양시기에 따른 alkaline phosphatase 활성도. 배양시기에 따른 UHMWPE 마모편을 투여한 군과 대조군간의 의미있는 차이는 없었다 ($p>0.05$).

마모편을 투여한 군에서 배양 14일째 정점을 이루고 감소하는 반면, 대조군에서는 지속적으로 증가하는 양상을 보였다(그림 6).

4. Osteocalcin mRNA의 발현

배양기간에 따른 Osteocalcin mRNA의 발현은 제1형 교원질 mRNA 발현과 비슷하게 UHMWPE 마모편을 투여한 군에서 14일째까지는 증가하였으나 이후로는 감소되었고, 대조군에서는 14일째부터 증가하였다(그림 7). 대조군에 비해 배양 7일째에 117±9%, 배양 14일째에 133±10%로 높았고, 배양 21일째에는 89±7%로 낮았으나 통계학적인 의미는 없었다($p>0.05$).

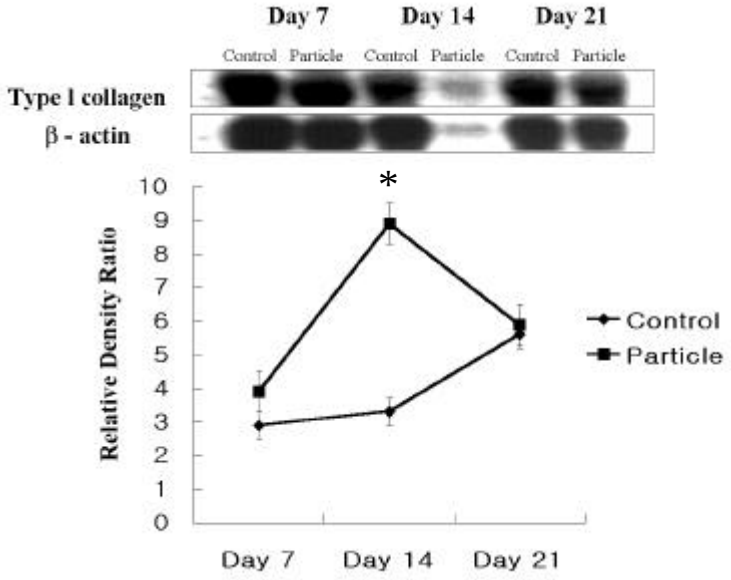


그림 6. 배양시기에 따른 제1형 교원질의 Northern blot 분석. 배양 14일째에 UHMWPE 마모편을 투여한 군이 대조군에 비해 높게 발현되었다(*: $p<0.05$). UHMWPE 마모편을 투여한 군은 배양 14일째 정점을 이룬 후 감소하는 반면에 대조군에서는 지속적으로 증가하는 양상을 보였다.

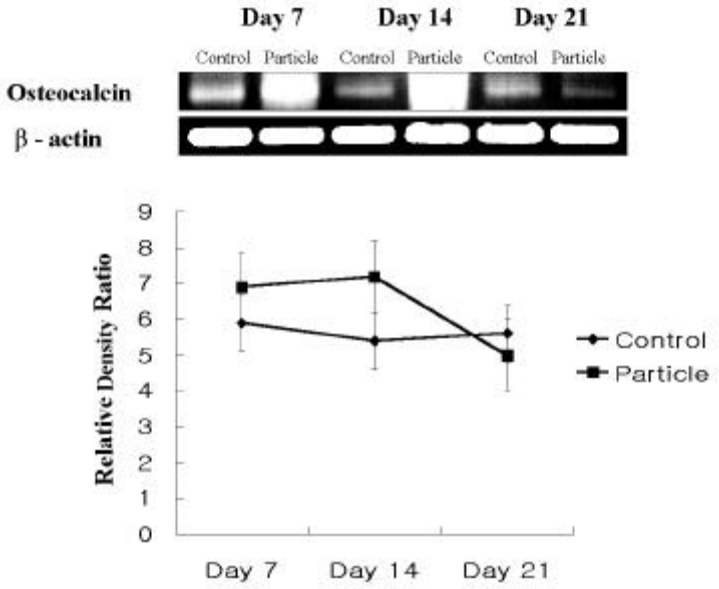


그림 7. 배양시기에 따른 osteocalcin의 RT-PCR 분석. UHMWPE 마모편을 투여한 군과 대조군간에 의미있는 차이는 없었다($p>0.05$).

5. 골결절 형성

골결절의 형성은 UHMWPE **마모편을 투여한 군에서 배양** 7**일째에** 15±2**개/**HPF(high power field)**로 관찰된 후, 배양** 14**일째에** 34±3**개/**HPF, **배양** 21**일째에는** 59±5**개/**HPF**로 지속적으로 증가하였으나 대조군에서는** 21**째에도 관찰되지 않았다**(**그림** 8).

6. OPG**와** ODF mRNA**의 발현**

OPG mRNA**의 발현은** 1 mg/ml **농도의** UHMWPE **마모편을 투여한 군에서는 대조군에 비해 배양** 7**일째에** 82±9%, **배양** 14**일째에** 96±9%**로 낮았고, 배양** 21**일째에는** 124±10%**로 높았으나 통계학적인 의미는 없었다**

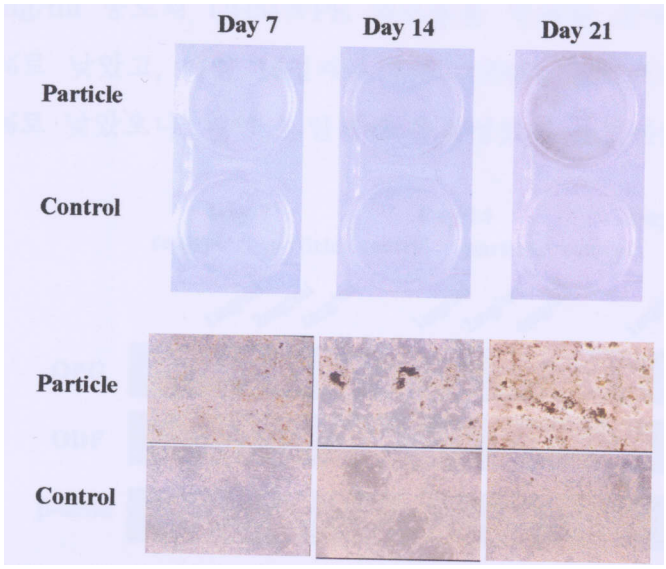


그림 8. 배양시기에 따른 골결절 형성(von Kossa 염색). UHMWPE **마모편을 투여한 군에서 배양** 7**일째부터 골결절이 관찰되어 지속적으로 증가하였으나 대조군간에서는 관찰되지 않았다.**

(p>0.05). 2 mg/ml **농도의** UHMWPE **마모편을 투여한 군에서도 배양** 7**일째에** 89±9%, **배양** 14**일째에** 89±9%**로 낮았고, 배양** 21**일째에는** 124±11%**로 높았으나 통계학적인 의미는 없었다**(p>0.05). 4mg/ml **농도의** UHMWPE **마모편을 투여한 군에서도 배양** 7**일째에** 82±8%**로 낮았고, 배양** 14**일째에** 102±9%, **배양** 21**일째에는** 109±11%**로 높았으나 역시 통계학적인 차이는 없었다**(p>0.05)(**그림** 9, 10). ODF mRNA**의 발현은** 1 mg/ml **농도의** UHMWPE **마모편을 투여한 군에서는 대조군에 비해 배양** 7**일째에** 74±7%, **배양** 14**일째에** 51±6%, **배양** 21**일째에는** 71±8%**로 낮았으나 배양** 14**일째만 유의한 차이가 있었다**(p<0.05). 2 mg/ml **농도의** UHMWPE **마모편을 투여한 군에서도 배양** 7**일째에** 101±9%**로 높았고, 배양** 14**일째에** 53±8%, **배양** 21**일째에는** 69±8%**로 낮았으나 배양** 14**일째만 유의성이 있었다**(p<0.05).

4mg/ml 농도의 UHMWPE 마모편을 투여한 군에서도 배양 7일째에 87±8%로 낮았고, 배양 14일째에 144±12%로 높았으며, 배양 21일째에는 48±9%로 낮았으나, 배양 14일째에 유의성있게 높았다($p<0.05$)(그림 9,11).

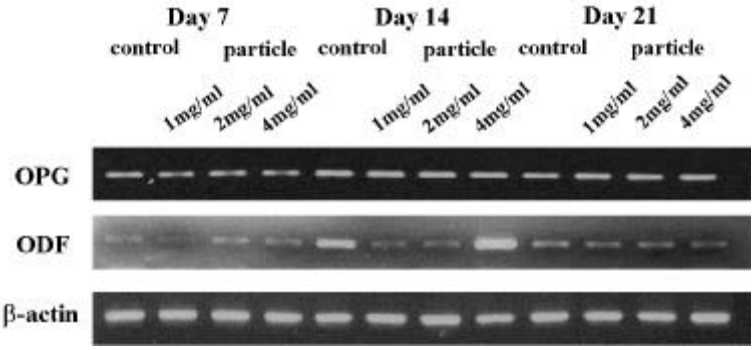


그림 9. 배양시기와 UHMWPE 마모편의 농도에 따른 OPG mRNA와 ODF mRNA의 RT-PCR 분석. OPG: osteoprotegerin, ODF: osteoclast differentiation factor.

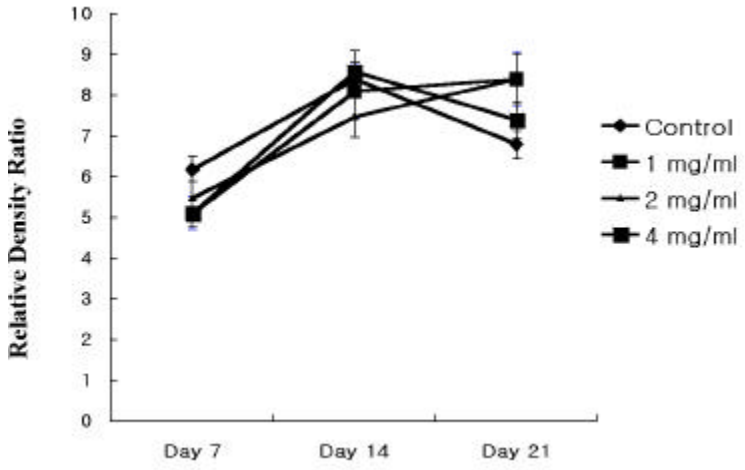


그림 10. 배양시기와 UHMWPE 마모편의 농도에 따른 OPG mRNA의 발현. 배양시기와 농도에 따른 의미있는 차이는 없었다($p>0.05$). OPG: osteoprotegerin.

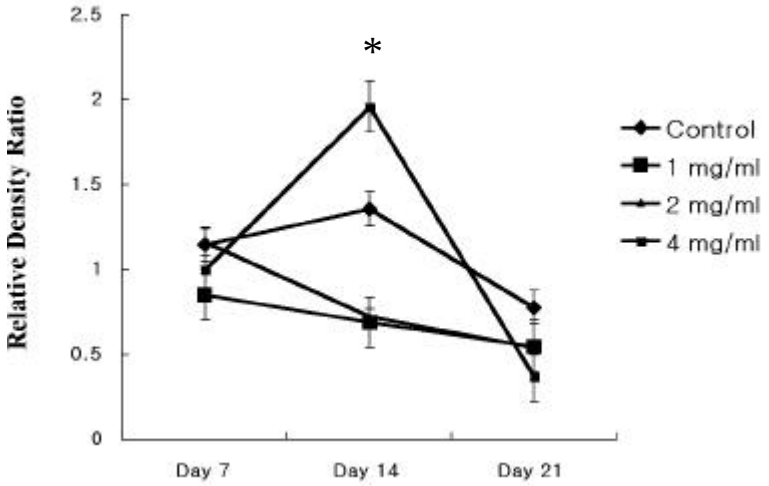


그림 11. 배양시기와 UHMWPE 마모편의 농도에 따른 ODF mRNA의 발현. 배양 14일째에 고농도(4 mg/ml)의 UHMWPE 마모편 투여군에서 높게 발현되었다(*: $p<0.05$). ODF: osteoclast differentiation factor.

IV. 고 찰

골용해와 무균성 해리를 보이는 조직에서 채취한 연부조직막의 조직학적 분석에 의하면 이물질 육아종 소견을 보이고 주로 마모편을 탐식한 대식세포와 섬유아세포가 분포한다.[8] 이물반응에 의해 유도된 대식세포와 섬유아세포로부터 여러 가지 생물학적인 인자가 분비되는데, 명확히 밝혀지지는 않았지만 IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE_2 등이 관여할 것으로 보고되고 있다.[6-9] 한편 이러한 마모편의 조직학적 반응과 생물학적 반응은 마모편의 종류, 수, 크기, 모양에 따라 영향을 받는 것으로 보고되고 있으며, 이물반응이 일어난 부위에서 골흡수가 발생하여 골용해성 강을 형성하게 되고 인공삽입물과 인접한 골사이에 해리를 유발한다.[25,26] 이와 같이 기존의 연구는 골흡수의 측면에서, 주로 대식세포와 파골세포, 섬유아세포에 집중되어 졌다.[3-11] 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.[12-15] 본 연구에서는 골아세포를 시험관내에서 배양하고, 인공관절 전치환술 후 골용해 소견이 보여 재수술을 시행한 환자에서 채취한 UHMWPE 마모편을 배양한 골아세포의 배양용기에 함께 넣어주어 UHMWPE 마모편이 골아세포의 증식과 분화에 미치는 영향과 OPG, ODF 등의 분비에 미치는 영향을 평가하여 파골세포의 활성의 조절에서 골아세포의 역할을 밝히는데 있었다.

본 연구결과에 의하면 골아세포의 증식율이 대조군에 비해 UHMWPE 마모편을 첨가한 군에서 의미있게 감소하였고 alkaline phosphatase의 활성도도 감소하였으나 통계학적 의미는 없었다. 반면에 제1형 교원질 mRNA 발

현과 골결절의 형성은 증가되었는데, 이는 UHMWPE 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, 무기질화 과정의 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 증식율이 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 phosphatase의 표현이 증가가 특징적이다. 무기질화 과정은 마지막 단계로 무기질화 과정에 필요한 osteocalcin, osteopontin, calcium의 축적이 이루어진다.[15] 본 연구의 결과를 이 과정에 적용시킨다면, UHMWPE 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 UHMWPE 마모편이 골아세포에 직접적으로 작용하여, 충분한 골아세포의 증식을 억제하고 골아세포의 분화과정을 조기에 유도하는 것으로 판단되었다. 이는 사람의 골아세포양 세포를 사용하여 시험한 이전의 보고와 일치되는 결과이다.[16,18]

본 연구에서 골아세포의 증식과 분화과정에서 UHMWPE 마모편의 직접적인 영향 외에도 골아세포와 파골세포의 상호작용에 중요한 역할을 하는 인자에 대해서도 분석하였다. 최근에 골아세포에서 생성되어 파골세포의 분화를 조절하는 OPG 및 ODF와 같은 새로운 인자들이 발견되었다. ODF는

TNF ligand 계열로 osteoclast differentiation and activation receptor (ODAR)에 작용하여 파골세포의 형성과 활성도를 증가시키는 것으로 알려져 있고, OPG는 ODF 수용체와 유사한 용해성 수용체로 ODF에 강한 친화성을 가지고 있어 ODF의 수용체와의 작용을 억제하는 osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF)로 알려져 있다.[17-23] 따라서 골흡수 과정은 OPG와 ODF의 균형을 통해 조절될 수 있고, OPG와 ODF는 골아세포에서 형성되므로, 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 UHMWPE 마모편의 농도에 따라 의미있는 차이는 없었다. 그러나 ODF mRNA의 발현은 저농도(1 mg/ml, 2 mg/ml)에서는 대조군보다 감소하였으나, 고농도 (4 mg/ml)에서 오히려 대조군보다 증가하였다. 이는 UHMWPE 마모편이 OPG의 발현에는 영향을 미치지 않으나 일정한 농도 이상에서는 ODF의 발현을 촉진하므로써 파골세포를 활성화하는 것으로 사료되며 UHMWPE 마모편의 농도와 골용해의 발생관계는 밀접한 관련이 있음은 이미 보고된 바 있어 본 실험의 결과와 일관성이 있다.[26,27] 그러나 저농도의 UHMWPE 마모편이 배양 14일째에 대조군보다 ODF의 발현을 감소시킨 점과 UHMWPE 마모편이 OPG의 발현에는 영향을 미치지 않은 점은 향후 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 사용된 UHMWPE 마모편보다 더 높은 농도에서는 OPG와 ODF 발현에 어떠한 영향을 주는지도 더 연구해야 할 과제로 남아 있다. 결론적으로 골용해의 복잡한 발생기전을 본 연구의 결과로만 해석할 수는 없지만, 대식세포, 파골세포와 이들 사이에 작용하는 인자들의 연구에서 탈피하여 UHMWPE 마모편이 골아세포에 직접적인 영향을 미쳤다는 점과 골아세포-파골세포사이의 상호관계를 일부 규명하였다는 점에서 추후 연구에 도움에 될 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

인공관절 전치환술 후 골용해 조직에서 채취한 UHMWPE 마모편을 백서의 두개골에서 골아세포를 분리하여 배양한 골아세포의 배양용기에 투여하여, UHMWPE 마모편이 골아세포의 증식, alkaline phosphatase 활성도, 기질형성(제1형 교원질, osteocalcin), 무기질화 과정, OPG와 ODF의 발현 등에 미치는 영향을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. UHMWPE 마모편은 골아세포의 증식을 억제하였으나, alkaline phosphatase의 활성도와 Osteocalcin의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았다.
2. 골아세포의 제1형 교원질 mRNA 발현과 골결절 형성의 분석에서 UHMWPE 마모편을 투여한 군이 대조군에 비해 기질형성과 무기질화 과정을 조기에 유도하였다.
3. OPG mRNA의 발현은 실험군과 대조군간에 의미있는 차이는 없었으나 ODF mRNA 발현은 UHMWPE 마모편의 고농도 투여군(4 mg/ml)에서 대조군에 비해 높았다.

이상의 결과를 분석하면 UHMWPE 마모편은 골아세포의 증식은 감소시켜, 골아세포의 골형성에 필요한 효소나 기질의 형성을 조기에 유도함으로써 골형성을 억제하였고, 파골세포에 영향을 미치는 ODF의 발현을 촉진하여 파골세포의 활성을 유도하는 것으로 판단되었다. 본 연구에서와 같이 UHMWPE 마모편이 직접적으로 골아세포의 영향을 미치는 기전과 파골세포와 섬유아세포에서 분비되는 cytokines에 의한 기전 중 어느 기전이 더 큰 영향을 미치는지는 앞으로 밝혀져야 할 과제이나 골용해의 과정 중에서 UHMWPE 마모편이 직접적인 골아세포를 억제하고 파골세포의 활성을 조절한다는 점은 골용해 기전의 중요한 부분을 규명한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Maloney WJ, Smith RL. Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: The role of particulate wear debris. ICL 1996;45:171-82.
2. Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop H, Schmalzried TP, Amstutz HC. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. J Biomed Mater Res 1995; 29:127-31.
3. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. J Bone Joint Surg 1993;75-A:863-79.
4. Shanbhag AS, Hasselman CT, Rubash HE. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. J Ortho Research 1996;14:1000-4.
5. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT. Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. Clin Orthop 1997;342:205-17.
6. Xu JW, Konttinen YT, Lassus J, Natah S, Ceponis A, Solovieva S et al. Tumor necrosis factor-alpha in loosening of total hip replacement. Clinical & Experimental Rheumatology 1996;14: 643-8.
7. Yokohama Y, Matsumoto T, Hirakawa M, Kuroki Y, Fujomoto N, Imai K et al. Production of matrix metalloproteinases at the bone-implant interface in loose total hip replacements. Lab

Invest 1995;73:899-911.

8. Kadoya Y, Revell PA, Al-Saffar N, Kobayashi A, Scott G, Freeman MAR. Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties: Histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. J Ortho Research 1996;14: 473-82.
9. Kim KJ, Hashimoto J, Morita H, Sato K, Kashiwazaki S. Effects of implant particles on the production of IL-1 and IL-6 by bone marrow cells. Trans Orthop Res Soc 1992;17:341.
10. Manlapaz M, Maloney WJ, Smith RL. In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. J Ortho Research 1996;14:465-72.
11. Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW, Athanasou NA. Humam arthroplasty derived macrophages differentiate in osteoclastic bone resorbing cells. Annals of the Rheumatic Diseases 1997;56:414-20.
12. Martinez ME, Medina S, del Campo MT, Garcia JA, Rodrigo A, Munuera L. Effect of polyethylene particles on human osteoblast cell growth. Biomaterials 1998;19:183-7.
13. Pollice PF, Silverton SF, Horowitz SM. Polymethylmethacrylate -stimulated macrophages increase rat osteoblast precursor recruitment through their effect on osteoblasts in vitro. J Ortho Research 1995;13:325-34.
14. Wang JY, Wicklund BH, Gustilo RB, Tsukayama DT. Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in

vitro. Clin Orthop 1997;339:216-26.

15. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J 1990;4:3111-123.

16. Gravallese EM, Goldring SR. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000;43:2143-51.

17. O'Keefe RJ, Schwarz EM, Boyce, BF. Bone metastasis: an update on mechanisms of bone resorption and therapeutic strategies. Curr Opin Orthop 2000;11:353-9.

18. Schwarz EM, O'Keefe RJ, Regis J. Breakthrough in bone: the molecular mechanism of osteoblast/osteoclast coupling revealed. Curr Opin Orthop 2000;11:329-35.

19. Neale SD, Fujikawa Y, Sabokbar A, Gundle R, Murray DW, Graves SE et al. Human bone-derived cells support formation of human osteoblasts from arthroplasty-derived cells in vitro. J Bone Joint Surg 2000;82-B:892-900.

20. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in culture of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. J Bone Miner Res 1999;14:1486-92.

21. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki 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 2000;43:259-69.

22. Lee S, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: Correlation with osteoclast-like cell formation. Endocrinology 1999;140:3552-61.

23. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteobl-astic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocor-ticoid-induced osteoporosis. Endocrinology 1999;140:4382-89.

24. Campbell P, Ma S, Yeom B, Schmalzried TP, Amstutz HC. Tissue digestion for wear debris particles isolation. J Biomed Mater Res 1994;28:523-6.

25. Maloney WJ, Smith RL, Schmalzried TP, Chiba J, Huene D, 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 1995;77-A:1301-10.

26. Schmalzried TP, Campbell P, Schmitt AK, Brown IC, Amstutz HC. Shapes and dimensional characteristics of polyethylene wear particles generated in vivo by total knee replacements compared to total hip replacements. J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 1997;38:203-10.

27. Shanbhag AS, Hasselman CT, Rubash HE. Technique for generating submicrometer ultra high molecular weight polyethylene particles. Clin Orthop 1997;344:33-43.

Abstract

Effect of polyethylene particles on osteoblasts in pathogenesis of osteolysis

Woo-Suk Lee

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Eung-Shick Kang)

Osteolysis has been recognized as a major limitation of long-term survival of implanted prostheses in total joint arthroplasty. The pathophysiology of osteolysis is complex and not yet fully understood. It was believed that osteolysis resulted from bone resorption secondary to osteoclast stimulation by cytokines released from mast cells and macrophages that had phagocytosed submicron wear particles. The effect of wear particles on osteoblasts is not well-known. And the interrelationship between osteoclast and osteoblast activity is closely regulated in the normal subject and is not fully understood. The relationship is altered in patients with implanted foreign material and submicron wear particle generation such that bone resorption exceeds production. To determine the role of osteoblast in the pathogenesis of osteolysis, I cultured the osteoblasts primarily isolated from rat neonate calvariums and then 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 osteoclast differentiation factor (ODF) mRNA according to culture periods by adding ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) particles retrieved from osteolysis tissue of revision surgery. The particles were not added in the control group.

The cell proliferation was analyzed using a hemocytometer and alkaline phosphatase activity was measured by spectrophotometer. The expression of type I procollagen mRNA was analyzed by Northern blot method and the expression of osteocalcin mRNA, OPG, and ODF mRNA was analyzed by RT-PCR methods. The bone nodule was counted by von Kossa technique.

The cell proliferation was increasing in both group on the 7th day. Particle group showed statistically significant decrease in cell proliferation compared to that of the control group. In alkaline phosphatase activity, there was no significant difference between both groups. The expression of type I procollagen mRNA was increased on the 14th day but it was not different to the control group on the 21th day. The expression of osteocalcin mRNA was similar pattern to type I procollagen mRNA but there was no significant difference between both group. The bone nodules appeared at the 7th day and they was increased with time. There was no appearance of bone nodule in the control group. The expression of OPG mRNA in particle group was similar to that of control group. The expression of ODF mRNA was significantly increased in high concentration particle group (4 mg/ml) on the 14th day.

Conclusively, rat osteoblasts exposed to retrieved UHMWPE particles in monolayer culture ceased the proliferation of osteoblast and produced early extracellular matrix maturation and mineralization process in vitro and they increased the expression of ODF promoting osteoclast activities. In osteolytic lesions, UHMWPE particles may have a direct effect on the growth of osteoblasts and a indirect effect on the activation of osteoclasts inducing an imbalance at bone remodelling.

Key Words : osteolysis, polyethylene particle, osteoblast, growth, differentiation, osteoprotegerin, osteoclast differentiation factor