

## Erythromycin이 마모편 입자에 의한 항염 신호 전달계에 미치는 영향

이상수\* · 최영희<sup>†</sup> · 오권익<sup>†</sup> · 최연정<sup>†</sup> · 강영희<sup>†</sup> · 박용욱\* · 김도영\* · 장준동\*

한림대학교 의과대학 정형외과학교실\*, 병리학교실<sup>†</sup>, 자연과학대학 식품영양학과<sup>†</sup>

**목적:** 인공 관절 주위 골용해증의 발생 과정에서 마모 입자에 의하여 대식 세포에서 분비된 사이토카인들이 RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand)에 의한 파골세포의 활성화 기작을 증강시킨다. 본 연구에서는 대식 세포의 반응을 마모 입자에 대한 반응과 RANKL에 의한 파골세포 분화 초기 과정을 구분하여 항염 신호계 (pro-inflammatory signals)를 비교하였다. 또한 항염(anti-inflammatory) 작용을 가진 것으로 알려진 Erythromycin이 각 신호계에 미치는 영향을 분석하여 마모편에 의한 골 흡수를 Erythromycin이 억제하는 기전을 밝혀 보려 하였다.

**재료 및 방법:** Raw 264.7 생쥐 대식 세포주를 사용하였으며, 마모 입자는 자극 효과를 상승시키기 위하여 골 시멘트 (PMMA: Polymethylmethacrylate)와 UHMWPE (ultra high molecular weight polyethylene) 입자를 혼합하여 사용하였다. 동일한 배양 조건에서 마모 입자를 처리한 대식세포와 RANKL을 처리한 대식세포에 대하여 TNF- $\alpha$ , MAPKs (mitogen-activated phosphorylation kinase), I- $\kappa$ B (Inhibitory  $\kappa$ B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 변화를 분석하였다. 또한 Erythromycin에 의한 상기 신호 전달 물질들의 변화를 분석하였다.

**결과:** Erythromycin은 마모 입자와 RANKL에 의한 ERK과 p38의 인산화, 마모편에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 증가를 억제하였으나, TNF- $\alpha$  분비와 RANKL에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성은 억제하지 못하였다. Erythromycin은 마모 입자에 의하여 억제된 I- $\kappa$ B의 활성을 증가시켰다.

**결론:** Erythromycin은 대식세포의 반응 중 RANKL에 의한 파골세포 분화 신호보다는 마모 입자의 자극에 의한 활성 산소와 NF- $\kappa$ B의 활성을 주로 억제한다. 그러므로 Erythromycin은 이러한 항염 작용을 통하여 골 흡수 억제 효과를 나타낼 것으로 예상되므로 향후 파골세포 분화 신호계에 관한 보강 연구가 필요할 것이다

**색인 단어:** 대식 세포, 마모 입자, RANKL, MAPK, 활성 산소, I- $\kappa$ B, Erythromycin

## 서 론

인공 관절 소재로부터 형성되는 마모 입자들은 삼입물 주위의 여러 가지 종류의 세포들을 자극하게 된다. 여기에는 골 모세포, 대식 세포, 파골 세포, 섬유 아세포 등이 포함된다<sup>26)</sup>. 즉 골용해증의 발생은 마모 입자에 의하여 삼입물 주위에 형성된 위막(pseudomembrane)에서 사이토

카인이 형성되며 이에 의한 파골세포 분화와 활성화가 일어나게 된다<sup>8)</sup>. 즉 마모 입자들의 직접적 자극에 의하여 형성된 항염(pro-inflammatory) 사이토카인들이 파골세포 분화 인자로 알려진 RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand)에 의한 파골세포의 활성화 기작의 상승 조절이 발생한다. 그러므로 인공 고관절 주위 골용해증 기전에서의 신호 전달계는 크게 마모편에 의한 항염 신호 기전(pro-inflammatory signaling)과 이 과정에서 형성된 사이토카인들에 의한 파골세포 분화(osteoclastogenesis signaling)의 신호 전달로 대별하여 이해할 수 있다. 골용해증에서의 대식세포(macrophage)는 마모입자의 자극에 대하여 항염 사이토카인들을 분비하여 염증성 신호를 전달한다. 이러한 조직 내의 대식세포는 파골세포와 같은 기원의 세포이므로 RANKL의 자극에 의하여 파골세포로의 분화가 가능한 세포이며 위막 내의 대식세포가 파골세포로 직접 분화가 가능하다는 주장도 있다<sup>23)</sup>.

※ 통신저자: 장 준 동  
서울특별시 영등포구 영등포동 94-200  
한림대학교 한강성심병원 정형외과  
Tel: 82-2-2639-5301  
Fax: 82-2-2631-9337  
E-mail: jdchangos@yahoo.com

\* 본 논문의 요지는 대한고관절학회 2005년도 춘계학술대회에서 발표되었음.

\* 본 연구는 2003년도 한국학술진흥재단 신진교수연구과제 지원사업(KRF-2003-003-E00131)으로 이루어졌음.

고유의 항균 작용 이외에도 여러 세포에서 항염(anti-inflammatory) 작용을 가지는 Erythromycin이 마모 입자에 의한 염증성 골 흡수를 억제하는 작용이 보고되어 있다<sup>6,11,21,24</sup>. Erythromycin은 NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa-B)의 활성화를 억제하여 항염 효과를 나타낸다. 파골 전구세포에서 NF- $\kappa$ B가 억제될 경우 RANKL에 의한 파골세포 분화가 억제되므로 마모 입자와 RANKL에 의한 NF- $\kappa$ B의 상위 신호 전달계의 변화와 여기에 Erythromycin이 미치는 영향을 분석하면 Erythromycin에 의한 염증성 골흡수 억제 기전을 이해할 수 있다. 이에 본 연구에서는 마모 입자에 노출될 경우 항염 사이토카인을 분비하는 항염 세포로서와 파골세포로 분화하는 전구세포로서 모두 작용할 수 있는 대식세포를 소재로 하여 마모입자에 대한 항염 반응과 RANKL에 의한 파골세포 초기 분화 과정으로 신호 전달계를 구별하여 NF- $\kappa$ B의 상위 신호 전달계를 포함한 항염 신호계를 비교하면서 Erythromycin의 작용 기전을 밝혀 보려 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Chemicals and Particles

UHMWPE (ultra high molecular weight polyethylene) 마모 입자는 Zimmer사 (Warsaw, Indiana, USA)로 부터 입수하였으며 Polymethylmethacrylate (PMMA: #19130, 1-10 micron, 1.19 g/cc) 마모 입자는 Polysciences<sup>TM</sup>사(Warrington, PA, USA), Erythromycin은 Sigma chemical<sup>TM</sup>사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

우태아 혈청(FBS: fetal bovine serum)은 Hyclone<sup>TM</sup>사(Logan, UT, USA), DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium)은 Gibco-BRL<sup>TM</sup>사 (Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 사용하였다. Mouse recombinant soluble RANKL은 Sigma chemical<sup>TM</sup>사 제품을 사용하였다. 다른 모든 시약들도 분자 생물학적 등급내지는 그 이상의 표준화된 것을 사용하였다.

### 2. 세포주와 세포 배양

생쥐 대식세포주(mouse macrophage cell line)인 Raw 264.7은 한국세포주은행(KCLB: Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. 세포는 10% 우태아 혈청을 포함한 DMEM<sup>TM</sup> (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 5% 이산화탄소, 95% 공기의 비율(v/v)과 37°C 온도 조건으로 유지하였다.  $\alpha$ -MEM (Minimal Essential Medium: Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하는 경우도 있으나 실험실 조건에 따

라 차이가 있어 본 실험에서는 DMEM을 사용하였다. DMEM 배지에는 NaCOH3를 1.5 gm/L의 농도로 사용하였다. 파골세포의 분화의 확인은 TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) 염색을 시행하여 확인하였다. 배지는 2~3일 마다 교체하였으며 보관 시에는 우태아 혈청 30%와 DMSO 10%가 포함된 DMEM 용액에 넣어 냉동 보관하였다. 필요할 때 다시 해동하여 2회의 계대 배양 이전에 실험에 사용하였다. 배양 중에는 세포가 군집 당 약 5개 정도로 뭉칠 때 plate를 교체하였다.

### 3. 마모 입자의 처리

UHMWPE마모 입자는 직경이 평균 3.6  $\mu$ m (2.0~23  $\mu$ m)이며 PMMA 입자는 1~10 micron의 크기이다. 입자는 70% ethanol 용액으로 세척하고 열처리를 하여 endotoxin을 제거하여sterile PBS에 담가 4°C에 보관하였다. 마모입자는 자극 강도를 높이기 위하여 UHMWPE (0.2 mg/ml)와 PMMA(0.2 mg/ml)를 혼합하여 사용하였다<sup>20</sup>.

### 4. 실험 모델의 설정

모델 A에서는 파골세포 분화 모델과 같은 배양 조건에서 Raw 264.7 세포주를 RANKL(100 ng/ml)을 처리하여 대식 세포가 파골 세포로 분화하는 환경(osteoclast differentiation environment)을 유도하였다. 모델 B에서는 Raw 264.7 세포의 대식 세포 배양 조건에서 준비된 혼합 마모 입자를 0.4 mg/ml의 농도로 첨가하였다. 1시간 동안 전 처리하여 대식 세포가 마모 입자에 대한 반응으로 항염 환경 (proinflammatory micro-environment)을 유도하였다. 상기 두 모델에서 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha)의 분비량, MAPK (mitogen-activated protein kinase) 활성화, I- $\kappa$ B 활성화 및 활성 산소(ROS: reactive oxygen species)의 변화를 측정하였다. 또한 Erythromycin 투여의 영향으로 인한 상기 신호 단백질의 변화를 측정하였다.

### 5. TRAP 염색에 의한 파골세포 형성 평가

배양이 종결된 plate는 고정 후 Sigma kit를 이용하여 Fast Garnet GBC base solution, sodium nitrite solution, naphthol AS-BI phosphate solution, acetate solution, tartrate solution등을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 세척 후 hematoxylin solution으로 대조 염색하여 공기에 건조시킨다. 현미경 하에서 검색하여 다핵성(한 세포당 3개 이상의 핵)의 TRAP 양성 세포를 파골세포로 간주하였다.

## 6. TNF- $\alpha$ assay

상기 두 모델에 각각 Raw 264.7 세포주에 PMMA (0.2 mg/ml) 와 UHMWPE (0.2 mg/ml) 이 들어 있는 DMEM 배양액에 1시간 전 처리하였고, Erythromycin을 투여하였을 때는 3시간 전 처리하였다. 모든 실험에서, 대조군에서는 배양액만 넣어서 배양하였다. 이 배양액은 TNF- $\alpha$  농도를 측정하기 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였으며, 효소 면역 측정(ELISA) kit를 이용하여 분석하였다.

## 7. Hydrogen peroxide production assay

활성 산소의 종류인 과산화수소 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )의 생산량을 측정하기 위하여  $\text{H}_2\text{O}_2$  assay kit (Oxis International, Inc. USA) 을 사용하였다. Raw264.7 cells PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)로 배양하였다. 부유액을 거두어서 ammonium iron sulfate, sorbitol 과 xylenol orange가 들어 있는 working solution에 섞었다. 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 560 nm 에서 광학밀도를 측정하여  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 농도를 구하였다.

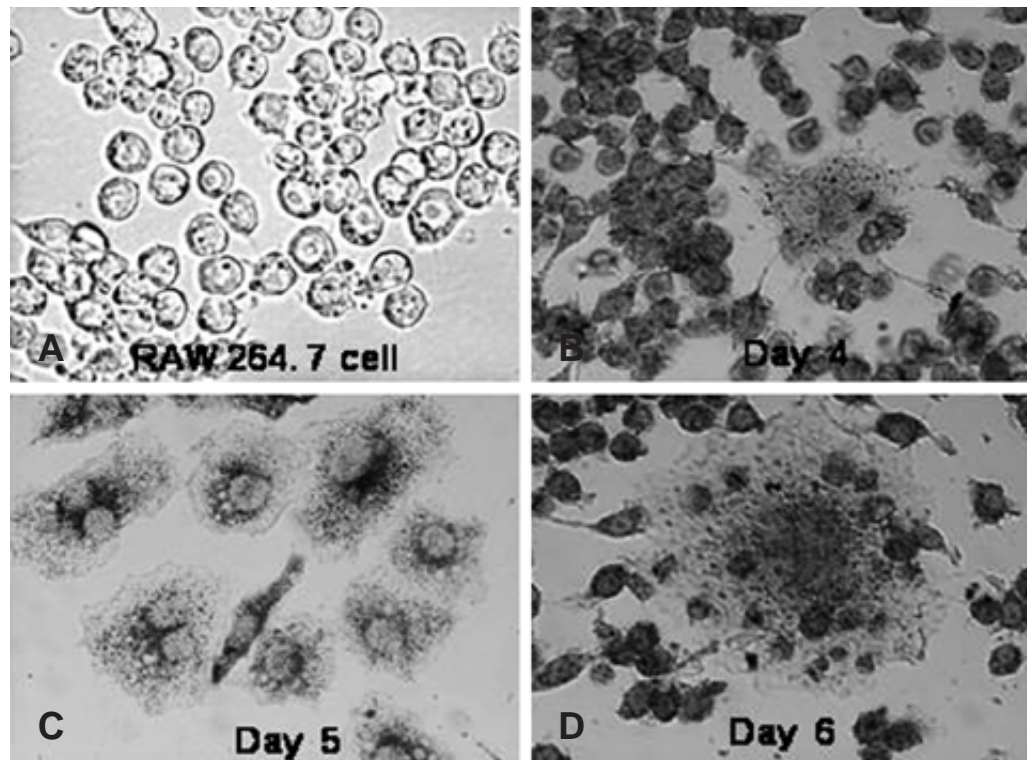
## 8. 단백질의 분리와 Western Blot Analysis

실험에서 얻은 Raw264.7 세포를 차가운 PBS

(phosphate buffered saline)에 2회 행군 후, 세포를 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM NaF and protease inhibitor cocktail)에 용해 시켜 30분간 얼음에 배양 후 10분 간격으로 vortex로 원심 분리하였다(15,000 g, 15 min). 부유액을 모아서, Bradford assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)에 의하여 단백질의 농도를 측정하였다. SDS-PAGE (8% or 10% reducing gels)를 이용하여 단백질을 분리하여, polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 옮겼으며, 5% non-fat milk로 막는다. Membrane을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 MAPK 또는 I $\kappa$ B의 일차항체로 밤새 반응시킨 후 TBST (10 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)로 세척하였다. 그 후 이차항체로 반응하였으며, TBST로 씻었다. 화학 발광계(chemiluminescence)로 띠(band)를 확인하였다.

## 9. 통계분석

모든 조건의 결과들은  $\text{mean} \pm \text{S.E.}$  로 계산하였으며, ANOVA test로 확인하였다. 통계학적으로 유의한 것은 p값이 0.05보다 적은 것으로 하였다.



**Fig. 1.** The number and intensity of TRAP positive multinucleated osteoclasts increase from day4 to day6 (B, C, D) after the addition of RANKL. Before adding RANKL, there is no osteoclast in Raw 264.7 cell line (A).

## 결 과

### 1. 대식세포주에서의 파골세포로의 분화

본 연구 모델의 타당성을 확인하기 위하여 생쥐 대식 세포주인 Raw264.7세포를 RANKL을 투여 후 여러 조건에서 배양하면서 파골세포로의 분화 가능성을 확인하였다. 파골세포의 분화의 최적 조건은 24 well plate를 사용하여 10,000 cell / well의 농도로 Raw264.7세포를 분주하고 5% FBS 가 첨가된 DMEM 용액에서 24시간 동안 배양 후 RANKL(100 ng/ml)을 투여 시 가장 적절한 분화가 발생하였다. 배지는 48 시간 마다 교체하며 RANKL을 첨가하였다. RANKL의 투여 3~4일경부터 TRAP 양성 세포를 가진 다핵세포가 발생하기 시작하였고 6일째 최대량을 이루었다(Fig. 1).

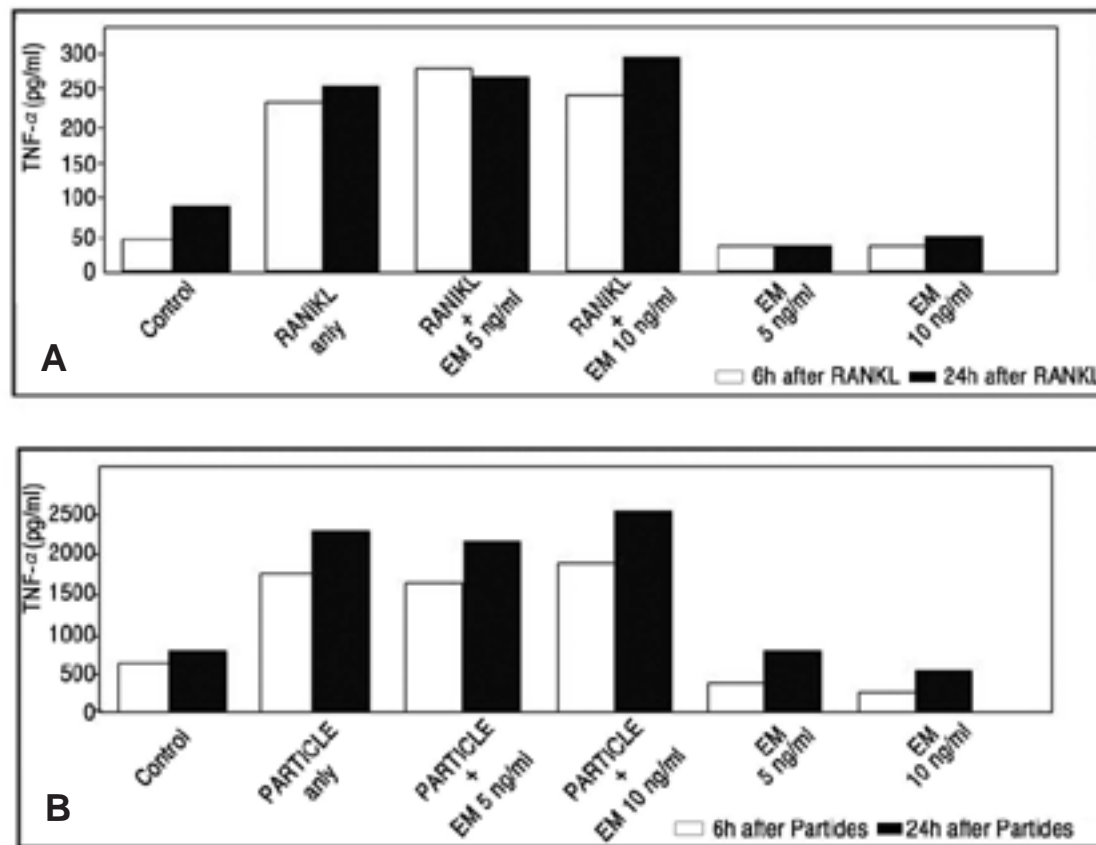
### 2. TNF- $\alpha$ 의 변화

모델 A와 모델 B에서 TNF- $\alpha$ 의 변화를 효소면역측정법

로 측정하였을 때, RANKL을 처리한 세포주보다는 마모입자를 처리한 세포주에서 TNF- $\alpha$ 의 농도가 현저히 증가하였다 (Fig. 2A-B). TNF- $\alpha$ 의 농도는 대조군의 세포주에서 약 50 pg/ml 이며, RANKL 을 처리한 모델 A에서는 200 pg/ml 에서 250 pg/ml 로 증가하였고, 마모입자를 처리한 모델 B에서는 1700 pg/ml에서 2700 pg/ml 으로 증가하였다.

### 3. Erythromycin에 의한 TNF- $\alpha$ 의 변화

Erythromycin은 두 모델 모두에서 RANKL과 마모입자들은, TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제하지 못하였다. 모델 A에서 Erythromycin(5 ng/ml 및 10 ng/ml)의 투여 후에도 TNF- $\alpha$ 의 농도는, 감소하지 않았으며(6시간 및 24시간) 오히려 증가되는 경향을 나타내었다(Fig. 2A). 모델 B에서는 Erythromycin(5 ng/ml) 에 의하여 TNF- $\alpha$ 가 약간의 감소가 발생하였으나(6시간 및 24시간), 10 ng/ml 농도에서는 오히려 TNF- $\alpha$ 의 분비가 오히려 증가



**Fig. 2.** The secretion of TNF- $\alpha$  in model B is higher than in model A. In model A, the amount of TNF- $\alpha$  are 200 and 250 pg/ml but, in model B, the amount of TNF- $\alpha$  are 1700 and 2700 pg/ml (A & B). But the Erythromycin cannot inhibit the secretion of TNF- $\alpha$  induced by RANKL and particle. At 6 and 24 hours, the concentration of TNF- $\alpha$  increases in model A but in model B, the concentration of TNF- $\alpha$  decrease slightly due to Erythromycin (5 ng/ml). However, with 10 ng/ml of Erythromycin, the concentration of TNF- $\alpha$  increased.



되는 경향을 나타내었다(6시간 및 24시간: Fig. 2B).

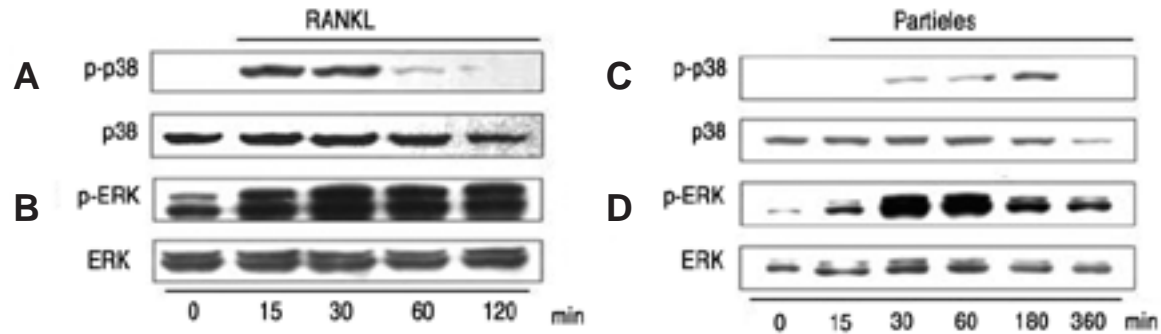
#### 4. MAPK의 활성화

RANKL과 마모입자에 의한 MAPK의 활성화를 확인하기 위하여 p-38 단백질, ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 단백질, JNK (Jun-N-terminal kinase) 단백질의 인산화(phosphorylation)를 관찰하였다. 이를 위하여 Raw264.7 세포를 RANKL 100 ng/ml과 마모 입자(0.4 mg/ml)를 처리하고 phospho-specific antibody를 사용한 immunoblot 분석을 통하여 MAPKs의 인산화를 분석하였다. 두 모델 모두에서 P38과 ERK의 활성화가 발생하였으며 시간 경과에 따라 증가 되는 양상을 보였다. 모델 A에서는 p38 단백질의 인산화가 증가하였는데, RANKL의 처리 후 30분 경에 대조군에 비하여 1.5% 로 가장 증가 폭이 컸으며, ERK의 인산화도 증가하였는데 30분에서 대조군에 비하여 15 %로 가장 증가 폭이 컸다 (Fig. 3A-B). 모델 B에서도 p38의 인산화가 증가하였는데, 처리 후 60분 경에 대조군에 비하여 1.0%의 증가 폭을 보였고, ERK의 인산화

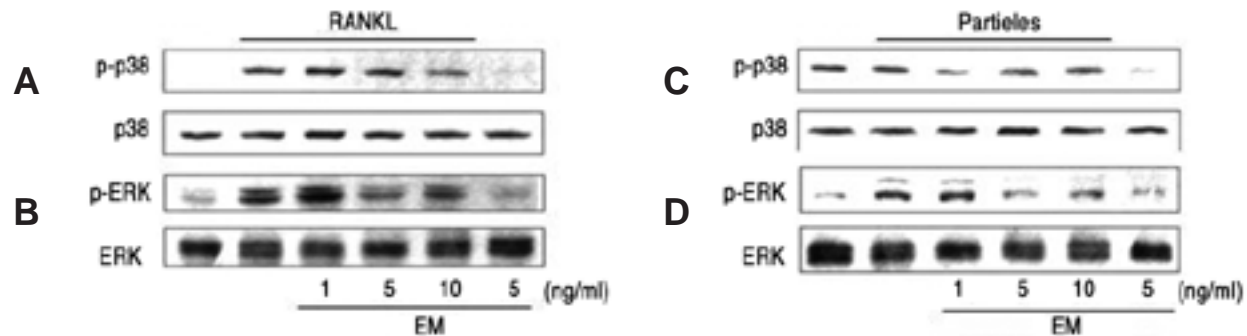
는, 60분 경에 30% 의 증가로 가장 현저한 변화를 나타내었다(Fig. 3C-D).

#### 5. Erythromycin에 의한 MAPKs의 변화

Erythromycin은 마모 입자와 RANKL에 의한 ERK와 p38의 인산화를 모두 억제하였다. 모델 A에서는 가장 증가 폭이 많았던 30분에 Erythromycin의 농도를 다양하게 하여 MAPK의 활성화를 관찰하였다. Erythromycin(10 ng/ml) 투여 후 p38의 인산화는 대조군에 비하여 투여전의 50% 이하 수준으로 감소하였다. ERK의 인산화는 Erythromycin(5 ng/ml, 10 ng/ml)을 투여하였을 때도 투여전의 40% 이하 수준으로 현저히 감소하였다(Fig. 4A-B). 모델 B에서는 대조군에 비하여 가장 증가 폭이 많았던 60분에 Erythromycin을 투여하여 MAPK의 활성화를 관찰하였다. p38의 인산화는 Erythromycin의 농도가 1, 5, 10 ng/ml의 순서로 투여 전에 비하여 약 45, 75, 65% 수준으로 감소하였다. ERK의 인산화도 5, 10 ng/ml 농도에서 투여 전에 비하여 25% 이하의 수준으로 현저히 감소하였다(Fig. 4C-D).



**Fig. 3.** MAPKs were evaluated by the phosphorylation of p38, ERK and JNK. The phosphorylation of p38 and ERK increase in both models. However, the timing of peak increase is different: At 30 minutes in model A and 60 minutes in model B, the phosphorylations of these proteins are the highest.



**Fig. 4.** The activity of MAPK after treatment of Erythromycin.

The Erythromycin inhibits the phosphorylation of p38 and ERK1/2 in both models in a dose dependent manner.

## 6. 활성 산소의 변화

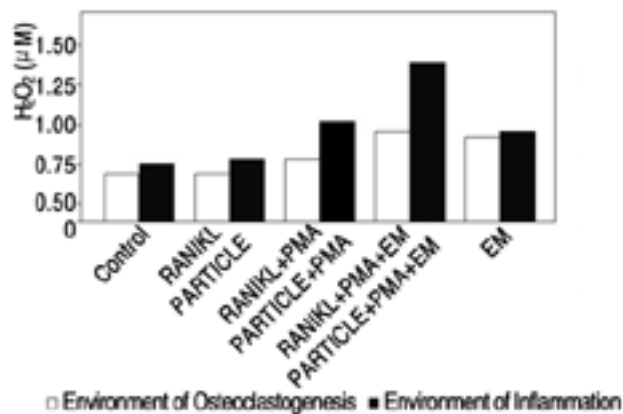
RANKL(100 ng/ml)은 ROS의 일종인  $H_2O_2$ 의 분비에 미치는 영향이 미미하였으나 마모 입자는  $H_2O_2$ 의 분비를 증가시키며 Erythromycin(5 ng/ml)을 투여 시 억제됨이 관찰되었다. 모델 A에서는  $H_2O_2$ 의 증가가 미미하였으며( $0.7 \mu M$ ), 활성 산소를 증강시키는 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate: 25 ng/ml)를 처리한 후에도 증가는 뚜렷하지 않았다 ( $0.8 \mu M$ )<sup>27)</sup>. 그러나, 모델 B에서는 마모 입자에 의한  $H_2O_2$ 의 분비가 증가되었다( $1.2 \mu M$ : Fig. 5).

## 7. Erythromycin 에 의한 활성 산소의 변화

모델 A에서는 활성 산소를 증강시키는 PMA(25 ng/ml)를 처리한 후에도( $0.8 \mu M$ ) 증가는 뚜렷하지 않았다. Erythromycin (5 ng/ml)을 투여한 후에도  $H_2O_2$ 의 변화는 미미하였다(Fig. 6). 그러나, 모델 B에서는 마모 입자에 의해 증가된  $H_2O_2$ ( $1.2 \mu M$ )는, PMA(25 ng/ml)로 그 증가가 증강되었으며( $1.5 \mu M$ ), 이는 Erythromycin (5 ng/ml)의 투여에 의하여  $0.9 \mu M$ 로 현저히 감소하였다(Fig. 5).

## 8. Inhibitory kappa B ( $I\kappa B$ )의 변화

RANKL은  $I\kappa B$ 의 활성화에 영향을 주지 않았으나, 마모 입자는  $I\kappa B$ 의 활성의 감소를 유발하였다. 모델 A에서  $I\kappa B$ 는 120 분까지 변화가 거의 없었다. 모델 B에서는  $I\kappa B$ 의 농도가 초기에 현저한 감소가 있는 후 180 분까지 다시 증가하였다(Fig. 6A-C).



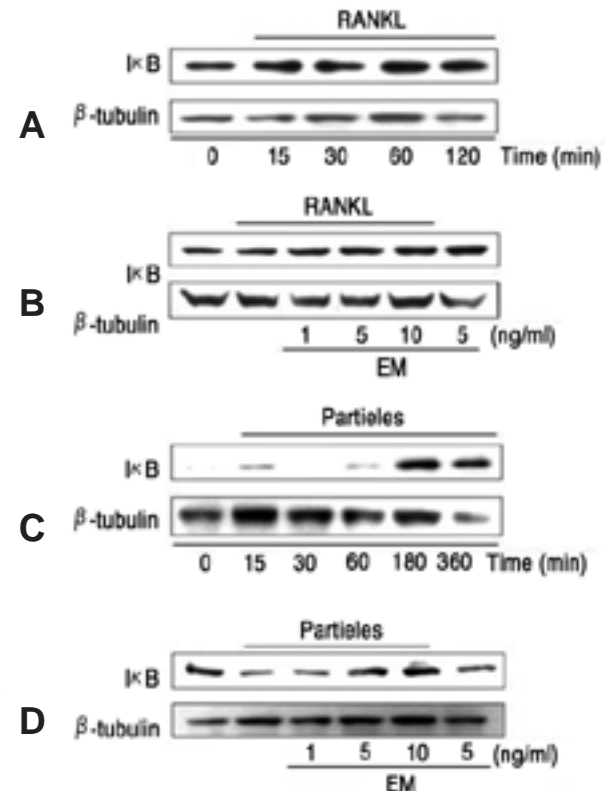
**Fig. 5.** The ROS activity was evaluated by the secretion of  $H_2O_2$ . In model B, the secretion of  $H_2O_2$  increase significantly. However, in model A, the increase of  $H_2O_2$  secretion is not significant. Erythromycin doesn't influence on ROS production in model A. But, in model B, Erythromycin decreases the concentration of  $H_2O_2$  released by particles.

## 9. Erythromycin 에 의한 $I\kappa B$ 의 변화

Erythromycin은 마모 입자에 의하여 감소된  $I\kappa B$ 을 다시 증가 발현하였다. 모델 A에서  $I\kappa B$ 는 Erythromycin (5 ng/ml)에 의하여 오히려 감소하였고, 10 ng/ml 일 때 경미한 증가가 발생하였다. 모델 B에서는  $I\kappa B$ 의 농도가 초기에 현저한 감소가 있는 후 180분까지 다시 증가하였다. Erythromycin의 농도가 5 ng/ml 및 10 ng/ml 일 때 대조군에 비하여 150% 이상의 수준으로 증가하였다 (Fig. 6B-D).

## 고 찰

골수모세포에서 활성화된 파골세포로 분화하는 과정은, 골수모세포, CFU-GM (colony forming unit of granulocyte/macrophage), 대식 세포, 융합 전 파골세포 (prefusion osteoclasts), 다핵 파골세포 (multin-



**Fig. 6.**  $I\kappa B$  do not change in model A but the concentration of  $I\kappa B$  decrease in model B. After 180 minutes, the concentration of  $I\kappa B$  increases in model B (A&C). With treating Erythromycin,  $I\kappa B$  expression increase in model B (D) However, in model A, Erythromycin (10 ng/ml) increases slightly the expression of  $I\kappa B$  (B). On the other hand, in model B, Erythromycin(5 ng/ml and 10 ng/ml) increases the expression of  $I\kappa B$  15% higher than the control (D).

ucleated osteoclast), 활성화된 파골세포(activated osteoclast)의 순으로 분화한다<sup>28)</sup>. 이 때 RANKL은 대식세포의 융합전 파골세포로의 분화, 다핵 파골세포로의 분화, 파골세포의 활성화를 자극한다. 파골세포로 분화된 것을 확인하는 표식 단백질로는 calcitonin receptor (CTR)와 TRAP이 있으며, 융합전 파골세포 단계에서부터 발현하기 시작한다. 본 연구에서 두 모델은 대식세포 단계에 해당한다고 볼 수 있다.

인공 관절 소재로부터 형성되는 마모 입자들은 삼입물 주위의 여러 가지 종류의 세포들을 자극하게 된다. 여기에는 골 모세포, 대식 세포, 파골 세포, 섬유 아세포 등이 포함된다<sup>24, 26)</sup>. 인공관절 주위 골용해증에 있어서의 대식세포의 역할은 주로 항염 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있다. 골용해증에서의 대식세포(macrophage)는 마모 입자의 자극에 대하여 항염 사이토카인들을 분비하여 염증성 신호를 전달한다. 이러한 조직내의 대식세포는 파골세포와 같은 기원의 세포이므로 RANKL의 자극에 의하여 파골세포로의 분화가 가능한 세포이며 위막 내의 대식세포가 파골세포로 직접 분화가 가능하다는 주장도 있다<sup>23)</sup>. 그러므로 인공 관절 주위 골용해증에 있어서의 대식세포는 더 이상 항염 세포만의 의미를 가지는 것이 아니며 파골 전구 세포로서의 의의와 작용 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

염증 환경에서의 대표적 항염 사이토카인으로 알려진 TNF- $\alpha$ 를 주로 생산하는 세포는 바로 대식세포이다. TNF- $\alpha$ 는 류마티스성 관절염, 치주염, 삼입물 주위 골용해증 등의 염증 환경에서 파골세포를 활성화를 유도하여 골 흡수를 증가시킨다. 마모 입자에 대한 반응으로서의 대식세포에서 생성된 TNF- $\alpha$ 는 조골세포(osteoblast)와 기질세포(stromal cell)의 핵 내에서 RANKL의 생산을 자극하게 되어 골흡수 기전으로 연결된다<sup>7)</sup>. 즉 TNF- $\alpha$ 는 파골 전구세포나 파골세포에서의 NF- $\kappa$ B, JNK, p38, ERK 등을 활성화시켜 파골세포로 분화시키며 골 흡수능을 유도하게 된다<sup>7)</sup>. 그러나 파골세포 분화를 유도하는 RANKL은 TNF- $\alpha$ 의 하류 신호계에 작용하는 것으로 알려져 있으므로 본 모델의 파골세포 초기 분화 환경에서 RANKL에 의하여 TNF- $\alpha$ 는 큰 영향을 받지 않는 것으로 사료된다. 또한 Erythromycin은 마모 입자에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비에도 영향을 주지 않으므로 Erythromycin의 골흡수 억제 기전은 TNF- $\alpha$ 와 독립적인 경로 혹은 TNF- $\alpha$ 의 하류 신호계에서 일어날 것으로 예상된다. Sanz 등은 macrolide 계열 약물은 폐 조직에서, 중성구의 부착 단백질(adhesion molecule)의 활성을 억제하여 항염 작용을 나타내지만, TNF- $\alpha$  분비는 감소시키지 못하였다고 보고하였는데, 본 연구 결과와 일치하는 내용이다<sup>24)</sup>.

TNF- $\alpha$ 의 하류 신호계에 해당 할 수 있는 MAPK는 성장인자 등의 외부의 자극에 의한 분열촉진 신호전달의 중

심역할을 수행한다. JNK나 p38는 활성화의 양상, 세포의 종류, 활동의 역치에 따라 결정되어 자극이나 염증 반응을 중개하는 역할을 하지만, ERK1/2의 경우 serine/threonine kinase로서 세포의 성장과 분화에 중요한 유전자 발현을 조절한다<sup>5)</sup>. 파골세포에서의 MAPK의 역할은 다음과 같다. p38가 RANKL-RANK 경로에 의한 파골세포의 분화를 촉진시키는 영향을 준다<sup>12, 15, 18)</sup>. 즉 RANKL에 의해 RANK가 활성화되기 위하여 TRAF (TNF receptor associated factor)-6의 작용이 필요하며 이 과정에 p38가 필요하다<sup>14)</sup>. 즉 p38은 파골세포의 분화 단계에만 주로 관여하게 되며<sup>18)</sup> ERK1/2는 분화된 파골세포의 생존에 주로 관여한다는 보고들이 많지만 최근에는 파골세포의 성장과 관련된 신호 전달계에서의 ERK의 역할이 중요시 되고 있다<sup>19)</sup>. 또한 ERK는 integrin  $\beta$ 3를 활성화하여 RANKL에 의한 세포 융합을 촉진시킨다<sup>13)</sup>. JNKs는 세포 분열 촉진 신호 전달의 중심역할을 수행하며, RANKL 자극에 의한 파골 세포 분화에는 JNK1이 관여하지만 JNK2는 작용하지 않는다<sup>5)</sup>. JNKs의 상위 표적(upstream target)은 RAW264.7 세포에서 MKK7으로 밝혀 졌다<sup>30)</sup>. JNK와 ERK의 하류 신호 전달계에는 AP-1 전사 인자(transcription factor) 등이 해당하며 여기에는 과거 파골 세포 분화의 핵심 조절 인자(key regulator)로 잘 알려진 c-fos가 포함되어 있다<sup>3)</sup>.

본 연구에서는 RANKL과 마모 입자에 의하여 대식세포에서 p38과 ERK의 활성화가 발생하였으므로 마모 입자에 의한 대식세포의 항염 반응과 RANKL에 의한 대식세포에 대한 파골세포로의 분화 자극에 MAPKs가 관여함을 알 수 있다. 마모 입자와 RANKL은 모두 파골세포 전구세포에서 MAPKs의 활성화를 통한 파골세포 분화 신호를 유도한다고 이미 알려져 있다<sup>1, 28)</sup>. 그러므로 본 연구의 결과들은 대식세포가 파골세포로 분화 되기 위하여 MAPK의 활성화가 필요하다는 기존의 산발적 보고들과 일치한다. 또한 마모 입자에 의한 자극으로 대식세포에서 유사한 MAPK의 활성화 현상을 보인 것은 마모 입자가 대식세포를 파골세포로 분화 시키는 RANKL과 유사한 자극(agonist)으로 작용하는 가능성을 암시한다. 그러나 본 결과에서는 모델 A (30분)는 모델 B (60분)에 MAPK의 활성화가 먼저 발생한 점은 마모 입자의 유사분열을 유도하는 세포 성장 자극력이 RANKL에 의한 성장 자극보다 미약하거나 어떠한 차이가 있다는 점을 의심 할 수 있으며 하류 신호계의 확인이 필요하다. 또한 RANKL의 존재 하에 마모 입자가 대식세포를 자극하는 형태의 생체 내 환경에서는 MAPK의 활성화가 더욱 증강될 가능성을 의심할 수 있어 향후의 연구가 필요하다. 또한 이 등<sup>9, 16, 17)</sup>은 titanium 마모 입자에 의한 신호 전달 중 파골세포의 활성화를 유도하는 c-fos의 SRE (serum responsive element)로의 신호 전달은 MAPK 비 의존성 경로로도

일어난다고 하였다. 그러나 본 연구 결과에서 파골세포의 초기 분화 단계에서의 생장 자극은 마모 입자에 의한 파골세포 분화 신호가 발생하더라도 MAPK 의존성 경로가 존재할 가능성을 제시하였다. 그러나 MAPK 비의존성 경로를 통한 c-fos로의 신호 전달계의 존재 유무는 많은 연구가 필요 할 것이다.

본 결과들에서 Erythromycin의 투여는 마모 입자와 RANKL에 의한 MAPK의 활성화를 억제하는 효과가 있었다(Fig. 4). 즉 이러한 효과는 대식세포가 파골세포 전구세포로서 혹은 항염 세포로서 작용할 경우 MAPKs가 Erythromycin의 표적으로 작용을 할 가능성의 확인이 필요하다. 즉 Erythromycin은 인공 관절 주위 골용해에서 마모 입자에 의한 항염 신호계, 마모 입자들에 의한 파골세포 분화 유도, RANKL에 의한 파골세포 분화 기전 모두에서 MAPKs의 활성화를 억제 작용을 할 가능성이 있으나 어느 기전에 중점을 가질 지는 현재로서는 미상이다. 그러나 최근 보고에서 Ren 등은 in vivo 연구에서 Erythromycin이 마모입자 입자에 의한 염증성 골용해 기전에 억제 작용을 한다고 보고하였으므로 마모 입자에 의한 항염 신호계에 주로 작용할 것으로 기대된다<sup>21)</sup>.

세포 내의 신호 전달을 위한 이차 신호 전달 물질에는 NO (nitric oxide)나 활성 산소 등의 활성 물질도 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>21, 28)</sup>. 최근에는 파골세포 내의 신호 전달에서의 NO와 활성 산소에 관한 많은 연구가 시도되고 있다<sup>2, 10, 16, 22, 27)</sup>. 활성 산소는 파골세포의 활성화 과정에 나타나는 신호 전달 물질이다. 활성 산소는 RANKL에 의한 신호 전달계에서 이차 신호 전달 물질의 역할을 하면서 파골세포의 분화와 활성화를 유도하며 한편 파골세포들은 활성 산소를 생성한다<sup>10)</sup>. 그러나 파골 전구 세포에서의 활성 산소를 생성 여부는 불확실하다<sup>10, 15)</sup>. 마모 입자에 의해 자극된 대식세포와 파골세포에서 활성 산소의 생성이 증가하면서 골용해 기전을 매개하게 된다<sup>27)</sup>.

본 실험에서는 마모 입자에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 증가한 반면, RANKL에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 증가는 미미하였다. 이러한 마모 입자에 의한 대식 세포에서의 활성 산소 증가 현상은 조골 세포에서의 RANKL의 생성과 분비를 자극하게 될 것으로 예상된다. 일반적으로 TNF- $\alpha$ 는 활성 산소의 생성과 분비를 증가시키고 활성산소는 NF- $\kappa$ B를 활성화시킨다<sup>2, 27, 29)</sup>. 그러므로 본 연구에서의 마모 입자에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성은 NF- $\kappa$ B의 활성화와 연계된 염증 신호계나 파골세포 분화 신호계에 작용하여 골흡수 기전의 활성화로 이어질 것으로 예상된다<sup>2)</sup>. 특히 Erythromycin은 마모 입자에 대한 대식 세포의 염증 반응으로서 발생하는 활성 산소의 생성을 억제하여 골흡수 억제 기전에 관여할 것으로 예상되며 향후의 연구가 필요하며 흥미로운 연구 소재가 될 수 있을 것이다.

NF- $\kappa$ B는 염증과 면역 반응에서 나타나는 유도성 전사인자이다. 그러나 NF- $\kappa$ B 신호 전달계는 염증과 면역 반

응은 물론 파골세포 분화에서도 관여함이 밝혀지면서 골면역학(osteimmunology)라는 용어까지 등장하게 되었다<sup>12)</sup>. 그러므로 골조직과 면역계간의 작용에는 혼란스러운 연관성이 존재함을 알 수 있으며 본 연구에서는 NF- $\kappa$ B 신호 전달계의 작용을 염증 신호계와 파골세포 분화 신호계로 구분하여 분석하려는 시도를 하였다. 본 연구에서 대식세포에 대한 RANKL에 의한 초기 분화 자극에는 NF- $\kappa$ B변화가 미약한 반면 마모 입자는 NF- $\kappa$ B의 활성화를 초기에 유도하며 할 것으로 예측할 수 있다. 마모 입자 자체가 파골세포의 분열 촉진 물질의 역할을 할 수 있다는 보고가 상당수 있다<sup>1, 4)</sup>. 이러한 이론적 배경으로 볼 때 마모 입자가 NF- $\kappa$ B를 통한 파골세포 분화를 유도한다는 가능성을 생각할 수 있으며 RANKL에 의한 파골세포 분화의 활성화 기전과는 약간 다른 기전들이 존재할 것으로 사료된다. 그러므로 마모 입자에 의한 파골세포 형성 (particle-induced osteoclastogenesis)는 일반적인 파골세포 형성과 다른 기전으로 일어날 것이며 심도 있는 연구가 필요할 것이다.

본 결과에서 마모 입자에 의해 억제된 I $\kappa$ B를 Erythromycin이 활성화시키는 현상은 Erythromycin의 전형적인 항염 효과로 생각된다. 또한 보고된 Erythromycin의 염증성 골흡수 억제 기전도 마모 입자에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 통한 항염 신호 전달 단계를 주로 억제함으로써 이차적인 파골세포 분화 자극 신호의 발생을 차단하여 일어날 것으로 사료된다. 또한 Erythromycin은 NF- $\kappa$ B와 연관된 신호 전달계 중 파골세포의 활성화 경로의 하나인 TNF- $\alpha$ 보다는 RANKL, TRAF-6, 활성 산소 등을 통한 신호계에 작용하는 것이 더 유력하므로 향후의 연구가 필요할 것이다.

Macrolide계열 약물은 최근 항염 작용을 가진 것으로 최근 밝혀지고 있으며 그 기전은 NF- $\kappa$ B를 억제하는 주로 기전에 관여하는 것으로 생각되고 있다. 특히 Erythromycin은 기관지 상피세포에서 NF- $\kappa$ B를 억제하는 경로로 항염 작용을 나타낸다<sup>6)</sup>. 같은 계열의 Clarithromycin도 말초혈액의 단핵세포에서 NF- $\kappa$ B를 억제하는 현상이 알려져 있다<sup>11)</sup>. 이와 관련된 신호 전달 기전으로서 중성구에서 부착 단백질의 활성을 억제하여 항염 작용을 나타내지만 대표적인 항염 사이토카인으로 알려진 TNF- $\alpha$ 는 감소시키지 못하였다는 최근 보고는 본 연구의 결과와 일치되는 맥락이다<sup>24)</sup>.

Ren등은 Erythromycin은 마모 입자에 의한 골흡수 억제 효과가 있다고 하였다<sup>20, 21)</sup>. 그 기전으로 Erythromycin의 NF- $\kappa$ B 억제 현상이 파골세포 및 전구 세포인 대식세포에서도 유효하여 파골세포 활성화를 위한 RANKL의 NF- $\kappa$ B 활성화 기전을 억제하여 일어난다고 하였다<sup>20)</sup>. 그러나 본 연구의 결과에서는 파골세포 분화의 전구 단계 환경에서 파골세포 분화를 유도할 수 있는 용량



(100 ng/ml) 에서도 RANKL은 I $\kappa$ B의 억제 유발이 미약하여 NF- $\kappa$ B의 증가가 미약함을 알 수 있다. 오히려 마모 입자에 의한 I $\kappa$ B의 활성 억제가 현저하며 이 현상을 Erythromycin이 억제하는 현상이 관찰되었다. 즉 Erythromycin의 마모 입자에 의한 골흡수 억제의 작용 기전은 RANKL에 의한 파골세포 초기 분화 환경을 억제하는 것 보다는 마모 입자에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화 억제 작용을 통한 항염 작용을 주로 하는 것으로 예상 할 수 있다. 또한 Erythromycin은 마모 입자에 의한 골흡수 증가의 주요 기전 중 하나로 알려진 TNF- $\alpha$ 의 억제에도 영향을 주지 못하였으므로 골용해의 억제는 다른 경로에서 일어나고 있음을 추측할 수 있다.

본 연구의 결과에 대하여 활성산소 신호전달과 관련된 이론을 적용하면 다음과 같은 이론을 생각할 수 있다. 대식 세포에 대한 마모 입자의 자극은 MAPK, TNF- $\alpha$ , 활성 산소의 증가, NF- $\kappa$ B의 활성화 순으로 전달되며 항염 기작의 상향 조절(up-regulation)이 일어난다. 이 과정에서 RANKL의 자극이 개입되어 NF- $\kappa$ B의 활성화를 통한 파골세포로의 분화 신호가 함께 발생한다. MAPK와 NF- $\kappa$ B가 항염 기작과 파골 세포 분화 신호의 전달을 매개하게 되며 궁극적으로 파골세포의 증가로 인한 골흡수 현상이 발생 할 것이다. 그러므로 인공관절 주위 골용해증에서의 대식세포는 항염 신호를 발생하는 염증 세포로서의 작용이 파골 세포 전구세포로의 작용보다 중요할 것으로 추정된다. 또한 Erythromycin은 마모 입자에 의한 활성 산소 생성과 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 항염 작용을 통한 골흡수 억제 효과를 보일 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구 모델에서 Erythromycin은 대식세포의 반응 중 RANKL에 의한 파골세포 분화 신호보다는 마모 입자의 자극에 의한 활성 산소와 NF- $\kappa$ B의 활성을 주로 억제한다. 그러므로 Erythromycin은 이러한 항염 작용을 통하여 골 흡수 억제 효과를 나타낼 것으로 예상되므로 향후 파골세포 분화 신호계에 관한 보강 연구가 필요할 것이다.

## REFERENCES

- 1) Abbes S, Clohisy JC, Abu-Amer Y: Mitogen-activated protein (MAP) kinases mediate PMMA-induction of osteoclasts. *J Orthop Res.* 21(6): 1041-8. 2003.
- 2) Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, et al: Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Expression in Osteoblast. *J Biol Chem.* 29: 280(17): 17497-506. 2005.
- 3) Cano E and Mahadevan LC: Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 20: 117-122. 1995.
- 4) Clohisy JC, Hirayama T, Frazier E, Han SK and Abu-Amer Y: NF- $\kappa$ B signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res.* 24 (2): 280-90. 2006.
- 5) David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH and Wagner EF: JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci.* 115:4317-4325.
- 6) Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K and Takizawa H: Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of Erythromycin in human bronchial epithelial cells: possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor-kappaB activation. *Antimicrob Agents Chemother.* 48 (5): 1581-5. 2004.
- 7) Feng X: Regulatory roles and molecular signaling of TNF-family members in osteoclasts. *Gene.* 350: 1- 13. 2005.
- 8) Goldring SR, Schiller A, Roelke M, O'Neill D and Harris W: The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg.* 65(A): 575-8. 1983.
- 9) Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al.: C-fos: a key regulator of osteoclast macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science.* 21; 266(5184): 443-8.1994.
- 10) Ha H, Kwak HB, Lee SW, et al: Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 301: 119- 127. 2004.
- 11) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, et al: Clarithromycin inhibits NF-kappaB activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 46:44-4.2001.
- 12) Jimi E and Ghosh S: Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev.* 208:80. 2005.
- 13) Kim HH, Chung WJ, Lee SW, et al: Association of sustained ERK activity with integrin  $\beta$ 3 induction during receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)-directed osteoclast differentiation *Experimental Cell Research* 289:368-377.2003.
- 14) Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, et al: Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* 20: 1271-1280. 2001.
- 15) LEE SE, Woo KM, Kim SY, kwack K, Lee ZH, Kim HH: The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone.* 30(1): 71-77. 2002.
- 16) Lee SS, Her JY, Woo CH, Kim JH, Chang JD: The signaling pathway of G-protein Rac and eicosanoid synthesis by titanium particles. *Journal of Korean Orthopaedic Association.* 36:317-325. 2001.
- 17) Lee SS, Woo CH, Her JY, Chang JD, Kim JH: Roles of

- Rac and cytosolic phospholipase A2 in the intracellular signalling in response to titanium particles. Cell Signal.* 15: 339-345. 2003.
- 18) **Li X, Udagawa N, Itoh K, et al:** *p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function Endocrinology (143) 3105-3113. 2002.*
  - 19) **Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, et al:** *Reciprocal role of ERK and NF-kappa B pathways in survival and activation of osteoclasts. J Cell Biol. 148: 333-342, 2000.*
  - 20) **Ren W, Li XH, Chen BD, Wooley PH:** *Erythromycin inhibits wear debris-induced osteoclastogenesis by modulation of murine macrophage NF-kB activity. Journal of Orthopaedic Research. 22:21-2.2004.*
  - 21) **Ren W, Wu B, Peng X, et al:** *Erythromycin inhibits wear debris-induced inflammatory osteolysis in a murine model. Journal of Orthopaedic Research. 24(2): 280-90. 2006.*
  - 22) **Reobuck KA, Jacobs JJ and Glant TT:** *New horizons in orthopaedic research: elucidation of cellular signal transduction pathways. J Bone Joint Surg, 81(A): 599-602, 1999.*
  - 23) **Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA:** *Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. J Orthop Res. 21(1): 73-80. 2003.*
  - 24) **Sanz MJ, Nabah YN, Cerda-Nicolas M, et al:** *Erythromycin exerts in vivo anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. Br J Pharmacol. 144(2): 190-201. 2004.*
  - 25) **Shanbhag A, Jacobs JJ, Black J, Galante JO and Glant TT:** *Effect of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. Clin Orthop. 342: 205-1. 1997.*
  - 26) **Vermes C, Roebuck KA, Chandrasekaran R, Dobai JG, Jacobs JJ and Glant TT:** *Particulate wear debris activates protein kinases and nuclear factor (B, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts. J Bone Miner Res, 15: 1756-176. 2000.*
  - 27) **Wang ML, Hauschka PV, Tuan RS and Steinbeck MJ:** *Exposure to particles stimulates superoxide production by human THP-1 macrophages and avian HD-11EM osteoclasts activated by tumor necrosis factor-alpha and PMA. J Arthroplasty. 17:335-46. 2002.*
  - 28) **William J, Boyle W, Scott S and David L:** *Osteoclast differentiation and activation. Nature 423: 337-342. 2003.*
  - 29) **Woo CH, Eom YW, Yoo MH, et al:** *TNF-( generates Reactive Oxygen Species generation via cPLA2-linked cascade. J Biol Chem. 275(41): 32357-3236. 2000.*
  - 30) **Yamamoto A, Miyazaki T, Kadono Y, et al:** *Possible involvement of I-kappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. J Bone Miner Res. (17): 612-621. 2002.*

## ABSTRACT

**Effect of Erythromycin on Pro-inflammatory Signalings by Particles**

**Sang-Soo Lee, M.D. \*, Young-Hee Choi, M.D. †, Kwon-Ik Oh, M.D. †, Yean-Jung Choi, M.S. †, Young-Hee Kang, Ph.D. †, Yong-Wook Park, M.D. \*, Do-Young Kim, M.D. \*, Jun-Dong Chang, M.D. \***

*Department of Orthopedic Surgery\*, Department of Pathology †, Department of Food and Nutrition †, Hallym University, Chuncheon, Korea*

**Purpose:** In periprosthetic osteolysis, cytokines, which are secreted from macrophages by the stimulation of particles, up-regulate the signaling for osteoclast activation through RANKL (Receptor activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand). This study compared the reaction to the particles and RANKL in the macrophages by examining the changes in the pro-inflammatory signals. In addition, because erythromycin has an anti-inflammatory effect, the effect of erythromycin on the pro-inflammatory signals by particles and RANKL was also analyzed to clarify the mechanism for the anti-resorptive effect with particles.

**Materials and Methods:** The Raw 264.7 cell line (murine macrophage cell line) was used for these experiments. The particles were made from PMMA (poly-methyl-meth-acrylate) and UHMWPE (ultra high molecular weight polyethylene) to enhance their stimulatory effects. Under the same culture conditions used for macrophages, the cells were treated with either particles or RANKL. The differences in the production of TNF- $\alpha$ , activities of MAP kinase, I- $\kappa$ B and reactive oxygen species (ROS) between the particle and RANKL treated macrophages were examined. The influence of erythromycin on these models was also observed.

**Results:** Erythromycin inhibited ERK and p38 phosphorylation in both models, and suppressed the increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the particle-treated macrophages. However, erythromycin inhibited neither the production of TNF- in both models nor the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the RANKL-treated macrophages. In addition, erythromycin reversed the suppression of I- $\kappa$ B by the particles.

**Conclusion:** For the response of macrophages, erythromycin mainly suppresses the particle induced ROS and NF- $\kappa$ B activation compared with RANKL-induced osteoclastogenesis signaling. Erythromycin might suppress particle-induced osteolysis through these anti-inflammatory effects. Therefore, further studies on the downstream signals of osteoclastogenesis will be needed.

**Key Words:** Macrophage, Particle, RANKL, MAPK, ROS, I- $\kappa$ B, Erythromycin