

파골 전구세포에서 여러 마모입자에 의한 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 전사 인자의 활성화

김용식* · 권순용[†] · 한석구 · 권재영 · 최남용

가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원*, 성모병원[†], 성바오로병원 정형외과

목적: 파골 전구세포에서 다양한 조성과 입자의 크기를 갖는 여러 마모입자들이 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 활성화에 미치는 영향을 관찰하고자 한다.

대상 및 방법: C57BL 쥐의 골수 대식세포로부터 파골 전구세포를 배양하여 PMMA (polymethylmethacrylate) 시멘트, polystyrene, titanium 입자 및 실패한 무시멘트형 인공 고관절 치환술 환자에서 채취한 마모입자에 대한 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 전사 인자의 DNA binding activity를 electrophoretic mobility shift assays (EMSA)로 관찰하였다.

결과: 내독소 검사상 PMMA 입자와 polystyrene 입자는 내독소 (endotoxin) 음성이었으며, titanium 입자와 환자에서 채취한 마모입자는 양성이었다. PMMA 입자에 의해 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 활동도는 증가하였으며, 특히 자극 30분 후 0.6 mg/ml에서 최적의 반응을 나타내었다. 또한 polystyrene, titanium 입자와 추출한 마모입자도 대조군에 비해 NF- κ B와 c-Jun/AP-1의 활동도를 증가시켰으며 내독소 제거 시 약 40%의 활동도가 감소되었다.

결론: 파골 전구세포에서 다양한 조성과 크기의 PMMA 입자, titanium 입자, polystyrene 및 환자에서 추출한 마모입자 모두 파골세포 분화 및 활성화에 중요한 두 신호전달 체계인 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 전사 인자의 DNA binding activity를 증가시켜 인체의 인공관절 주위 골융해 기전에 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 전사 인자는 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

색인단어: 전사 인자, NF- κ B, c-Jun/AP-1, 마모 입자, 파골 전구세포, Electrophoretic mobility shift assay

서 론

마모입자에 의한 인공관절물 주위 골융해는 인공관절 치환술 후 장기추시상 인공관절물의 생존을 위협하는 가장 심각한 문제가 된다¹²⁾. 이러한 병적 골소실(bone loss)은 인공관절물에서 떨어져 나온 마모입자에 의해 파골세포의 생성과 분화가 촉진되어 발생한다. 마모입자는 섬유세포, 조골세포 및 기질세포(stromal cells)에서 파골세포의 분화를 활성화시키는 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 염증 전구 cytokine 단백질 (proinflammatory cytokines)과 RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand)을 생성하여 간접적으로 파골세포 형성(osteoclastogenesis)을 촉진시킬뿐만 아니라, 직

접적으로 파골 전구세포를 분화 및 활성화시킨다^{6,7,21)}. 최근 파골세포 발생에 관여하는 세포내 기전으로 전사 인자 NF- κ B와 c-Jun/AP-1이 중요하다고 하였다¹⁴⁾. NF- κ B 전사 인자는 파골세포의 분화에 필수적이며, NF- κ B의 활성화를 차단하면 마모입자에 의한 파골세포 활성이 발생하지 않는다고 보고하였다^{5,8)}. AP-1 (Activator protein-1)은 dimeric complex로 구성되며 subfamily로는 Fos, Jun, ATF와 CREB 등이 있다. 이중 Fos계의 c-Fos와 Jun 계의 c-Jun 전사 인자가 파골세포 형성에 중요하며, 실험적으로 c-Fos 또는 c-Jun knockout mice는 파골세포를 형성하지 못해 골경화증 (osteopetrosis)이 발생한다고 하였다²⁸⁾. 이에 저자들은 다양한 크기와 조성의 마모입자가 파골 전구세포의 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 활성화에 미치는 영향을 비교 관찰하였다.

투고일: 2008년 4월 15일 1차수정일: 2008년 5월 20일
2차수정일: 2008년 7월 14일 게재확정일: 2008년 7월 14일

※ 통신저자: 한 석 구

서울특별시 동대문구 전농동 620-56
가톨릭대학교 의과대학 성바오로병원 정형외과
TEL: 82-2-958-2448
FAX: 82-2-965-1456
E-mail: hnsukku@catholic.ac.kr

대상 및 방법

1. 마모입자

PMMA 입자 (Polysciences, Warrington, PA, U.S.A),
는 평균 6.2 μ m의 직경을 갖는 구형으로 95% 이상이 10

μm 이하의 크기였다. 이를 15분간 100% ethanol로 씻고 (x4) overnight로 담가 증발시킨 후, PBS로 씻어(x4) serum free MEM으로 resuspend하고 -20°C 에 보관하였다. Titanium 입자 (Johnson Matthey, Wayne, PA, U.S.A.)는 평균 $2.1 \mu\text{m}$ 크기로 전자현미경상 모양은 구형, 입방형 또는 불규칙한 형태였고, polystyrene (Polysciences, Warrington, PA, U.S.A.)은 구형으로 평균 직경 $0.1 \mu\text{m}$ 의 제품을 각각 사용하였다. 추출한 마모입자는 8명의 마모와 골용해로 실패한 무시멘트형 고관절 대체환술 환자의 인공관절주위 조직을 Margevicius 등¹⁷⁾의 방법으로 분리하여 얻었으며 Decking 등의 방법¹⁰⁾으로 시행한 scanning electromicroscopy (SEM)상 평균 $0.87 \mu\text{m}$ 크기였고, energy dispersive X-ray analysis (EDX)와 (X-ray photoelectron microscopy (XPS) 검사상 85%이상이 CoCr이었다.

2. 내독소 검사 및 제거

모든 마모입자는 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay를 통해 내독소 검사를 하였고, PMMA 입자 및 polystyrene은 음성이었으나 titanium 입자와 환자에서 추출한 마모입자는 내독소 검사상 양성이었다. 내독소 제거는 Ragab 등의 방법²⁰⁾으로 제거하였다.

3. 파골 전구세포 채취

생후 4~6주의 C57BL 쥐의 골수로부터 골수 대식세포 (bone marrow macrophage)를 얻어 이미 발표된 방법²⁾에 따라 파골 전구세포를 배양하였다. 약술하면 쥐의 대퇴골 및 경골을 MEM으로 세척하여 얻은 골수세포에 M-CSF (1000 U/ml)를 넣고 37°C , 5% CO_2 에서 24시간 배양 후 100 mm^2 세포 배양용기에 부착된 기질세포를 제거하고 부착하지 않은 세포들을 Ficoll-Hypaque gradient 용액에 넣고 원심 분리하여 monocyte/macrophage 계열의 세포를 얻었다. 이를 αMEM (heat inactivated 10% FBS)으로 분주한 후, M-CSF (10 ng/ml)을 넣고 37°C , 5% CO_2 에 배양하였다. M-CSF는 2일 간격으로 투여하면 세포들은 용기바닥에 부착하며 배양 7일째는 monocyte-specific $\alpha\text{naphthyl acetyltransferase}$ activity가 99%이상 보였고, M-CSF 제거시 72시간 내에 모든 세포는 사멸하였다. 이러한 M-CSF dependent bone marrow macrophage는 배양 3일째 RANKL (Receptor Activator of NF- κB ligand)를 마모입자 투여 전 처리하고 배양 4일째 마모입자를 투여하여 마모입자에 대한 파골 전구세포의 반응을 관찰하였다.

4. 핵 단백질 분리(Nuclear extraction)

파골 전구세포인 골수 대식세포에 마모입자를 투여 후, ice-cold PBS로 두 번 씻은 후, 5 mM EDTA와 5 mM EGTA PBS로 용기 바닥에 자란 세포들을 떼어내었다. 3000 rpm으로 10분간 4°C 에서 원심 분리 후, hypotonic lysis buffer (HLB) A (10 mM HEPES, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM AEBSF, 5 ug/ml pepstatin A, 5 ug/ml leupeptin)를 15분간 얼음 속에서 반응시켜 세포를 용해하고 10% NP-40를 넣어 0.64% 농도로 만들었다. HLB A와 nuclear extraction buffer A를 이용하여 핵과 세포질 단백질을 분리하였다. 원심 분리 후, 세포질 단백질을 제거하여 얻은 핵 단백질 pellet을 nuclear extraction buffer B (20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 1.2 mM MgCl, 0.2 mM EDTA 25% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM AEBSF, 5 ug/ml pepstatin A, 5 ug/ml leupeptin)로 재분주하여 30분간 0°C 에서 반응시켰다. 15000 rpm으로 5분간 원심 분리 후, 부양액을 새 튜브에 넣고 BCA kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)로 단백질 농도를 정량하였다. 모든 단백질은 EMSA 시행까지 -80°C 에 보관하였다.

5. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

각각의 샘플 중 10 ug의 핵단백질을 20 μl binding buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol, 1 μg poly dI-dC, 10% glycerol)에서 TNF promoter의 kB3 site에서 얻은 5'-AAA CAG GGG GCT TTC CCT CCT C-3' 염기배열의 NF- κB end-labeled double stranded oligonucleotide probe와 c-Jun/AP-1 oligonucleotide (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, U.S.A.)에 실온에서 60분간 반응시켰다. 이를 4°C , 4% polyacrylamide gel에서 전기 영동 후, gel을 말려 필름을 찍고 현상하였다. 현상된 필름은 Biospectrum densitometry (UVP, Upland, CA, U.S.A.)와 VisionWorks program (UVP, Upland, CA, U.S.A.)을 이용하여 정량적 분석을 하였다.

결 과

모든 마모입자를 이용한 실험 전, PMMA 입자를 이용하여 파골 전구세포에서 NF- κB 와 c-Jun/AP-1 전사 인자의 DNA binding activity를 실험하였다. PMMA 0.6 mg/ml (4.74×10^7 particles per 15×10^6 cells)을 파골 전구세포에 투여 30분 후에 NF- κB (p50/p65)의 활동도는 대조군에 비해 크게 증가하였다(Fig. 1). 또한 PMMA 입자(0.6 mg/ml)투여 후, NF- κB 의 p50와 p65 subunit dimer의 DNA binding activity는 TNF 또는 RANKL과 같이 대조군에 비해 크게 증가하였으며 이는 투여된

PMMA 농도에 비례 (dose responsive)하였다. c-Jun/AP-1 전사 인자의 DNA binding activity는 TNF, RANKL 또는 NF- κ B와 같이 PMMA 입자 투여 30분 후 대조군에 비해 크게 증가하였다(Fig. 2). 본 실험으로 0.6 mg/ml PMMA 입자, 1 mg/ml titanium 입자, 10 μ l/ml polystyrene 및 0.2 mg/ml의 추출된 마모입자에 대한 각각의 NF- κ B의 DNA binding activity는 대조군에 비해 모두 증가하였으며, 특히 densitometry상 추출된 마모입자는 내독소 제거 시 약 40%의 활동도가 감소하였다(Fig. 3). 또한 c-Jun/AP-1 전사 인자의 활동도는 대조군에 비해 추출된 마모입자, titanium 입자, PMMA 입자 및 polystyrene 모두 자극 30분 후 대조군에 비해 증가하였

고, 내독소 제거 시 c-Jun/AP-1의 DNA binding activity는 약 40% 감소하였다(Fig. 4).

고 찰

인공관절 치환술 후 장기 추시상 인공관절 주위 골용해는 가장 흔한 합병증으로 알려졌으며, 인공관절의 실패를 일으키는 가장 흔한 합병증인 해리(loosening)의 원인이기도 하다¹⁾. 인공관절 주위 골용해는 관절면 또는 골-삽입물간에서 발생하는 마모입자에 대해 반응하는 면역기전의 결과이며, 분자생물학의 발달로 그 기전이 최근 계속 밝혀지고 있다. 특히 인체내에서 골흡수를 담당하는 파골

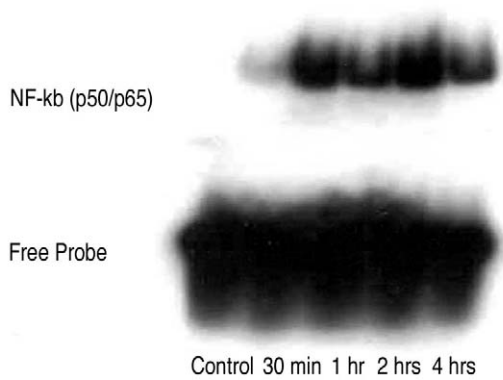


Fig. 1. PMMA particles (0.6 mg/ml) activate NF- κ B (p50/p65) in osteoclast precursor cells for the times interval indicated.

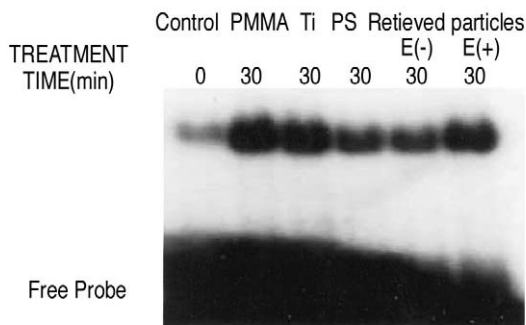


Fig. 3. EMSA shows increased NF- κ B (p50/p65) activity by PMMA (0.6 mg/ml), Ti particles (1 mg/ml), polystyrene (10 μ l/ml), and retrieved particles (0.2 mg/ml) in osteoclast precursor cells. The activity of NF- κ B by endotoxin-positive retrieved particles was higher than by endotoxin-negative particles. (PS: polystyrene, E: endotoxin).

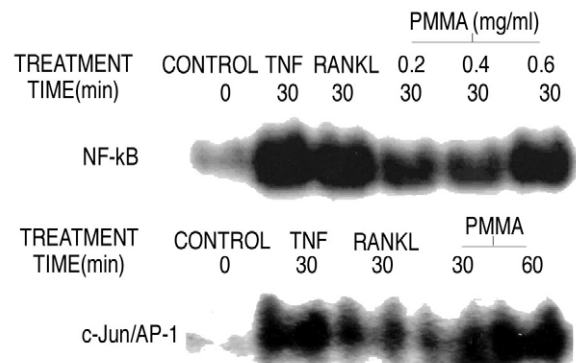


Fig. 2. PMMA particle exposure stimulates nuclear translocation of the p50 and p65 NF- κ B subunits in dose responsive manner (above). Also, DNA binding activity of c-Jun/AP-1 was markedly increased by PMMA particles (below). TNF (5 ng/ml) and RANKL (20 ng/ml) served as as positive controls. EMSA of nuclear extracts were prepared from osteoclast precursors after 30 minutes.

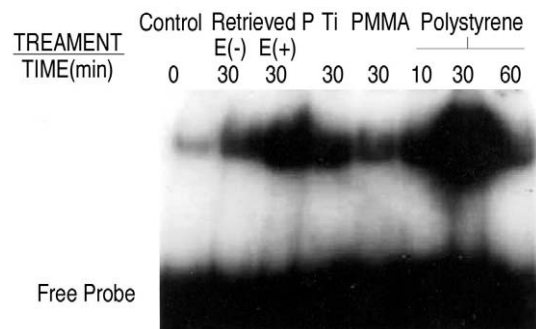


Fig. 4. DNA binding activity of c-Jun/AP-1 in osteoclast precursor cells was increased by retrieved particles (0.2 mg/ml), titanium particles (1 mg/ml), PMMA (0.6 mg/ml) and polystyrene (10 μ l/ml). Particle-induced c-Jun/AP-1 DNA binding affinity was significantly reduced in the absence of endotoxin. Nuclear extracts at 30 minutes after polystyrene exposure shows a maximal response.

세포의 분화 및 활성화에 결정적인 역할을 하는 RANKL의 발견으로 골용해의 병리기전에 대한 실험적 연구는 크게 진척되었다. RANKL은 osteoprotegerin ligand (OPGL), osteoclast differentiation factor (ODF) 또는 TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)라고 불리우며 TNF계의 cytokine으로 파골세포를 분화 및 활성화시킨다. 골모세포, 기질세포 또는 T 세포가 분비하는 RANKL이 결핍된 실험쥐는 골경화증이 발생하며, RANKL은 nuclear transcription factor κ B (NF- κ B)을 매개하여 파골세포를 분화시킨다^{13,15}.

NF- κ B는 TNF- α ¹, lipopolysaccharide¹⁹ 및 마모입자^{2,25}에 대해 초기에 반응하는 유전자 (early response gene)이며, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, c-Rel 등 Rel homology domain (RHD)을 공유하는 다섯 종류의 subunit으로 구성되어 있고 각종 면역반응, 세포성장, 세포사멸 (apoptosis), 염증반응 뿐만 아니라 암 발생에도 관여한다고 보고되었다^{4,17}. 세포 외 자극이 없을 때는 세포질 내에 I κ B (Inhibitor of NF κ B)와 결합해 있으며, RANKL, TNF, lipopolysaccharide 등의 세포 외 자극이 있으면 I κ B 인산화의 활성화와 함께 I κ B의 tyrosine염기가 인산화되어 I κ B는 26S proteasome에 의해 제거되며, 유리된 NF- κ B는 세포핵 내로 이동하여 DNA와 결합하여 target gene발현에 관여한다^{1,19,27}. 여러 보고들^{2,7,25}에 의하면 PMMA 입자, titanium 입자 및 추출된 마모입자가 쥐의 골수 대식세포 또는 대식세포 세포주 (ANA-1, THP-1)에서 NF- κ B를 활성화시킨다고 하였다. 인공관절의 가장 흔한 마모재질인 polyethylene¹²은 섬유세포를 분화시켜 염증 전구단백질을 생성하고²³, 골모세포에서 RANKL을 유리시켜 파골세포 형성을 촉진시킨다고 알려졌다¹¹.

하지만 polyethylene의 비중은 배양액보다 월등히 적어 세포배양액 위에 부양(floating)하며 세포 배양용기 바닥에서 자라는 대식세포와 접촉하지 어렵기 때문에 polyethylene 마모입자를 이용한 실험은 근본적으로 한계가 있다. 따라서 본 저자들은 polyethylene과 조성이 비슷하지만 보다 비중이 크며 액상 형태로 사용되는 polystyrene을 실험에 사용하였다. 또한 마모입자에 의한 NF- κ B의 활성화를 증명하기 위해 여러 in vivo⁵ 및 in vitro 실험⁸에서 약제를 이용한 NF- κ B의 활성화 차단으로 마모입자에 대한 파골세포의 분화 억제가 증명되었다. 본 연구에서는 NF- κ B p50와 p65의 DNA binding activity를 관찰하여 그 활동도가 여러 종류의 마모입자에 의해 증가된 것으로 밝혀졌다. 여러 NF- κ B subunit 중 p50와 p65를 관찰한 이유는 이미 밝혀진대로 titanium 입자²¹와 PMMA 입자⁷에 의한 p50와 p65 subunit의 활성화가 확인되었고, Soloviev 등²⁵은 titanium을 ANA-1세포에 투여하여 p105를 관찰하였는데 p105는 p50과 p65가 결

합된 전구 단백질이기 때문이다. 그러나 마모입자에 따른 다른 subunit을 포함한 subunit간의 활동도 차이에 대해서는 아직 보고된 바 없으며, 각 subunit의 기능적 역할 차이에 대해서는 향후 연구가 필요하다고 생각된다.

전사 인자 복합체 AP-1은 Fos, Jun, ATF와 CREB으로 구성되며 세포의 증식, 분화 및 사멸 등에 광범위하게 관여하는 단백질이다. NF- κ B와 마찬가지로 dimer형태로 존재하며, 이 중 Jun (c-Jun, Jun B, Jun D) 단백질과 Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2) 단백질이 파골세포의 분화 과정에 중요하다고 보고되었다¹⁴.

Growth factor, cytokines, polypeptide hormone, 세균감염과 RANKL 등의 자극에 의해 MAPK (mitogen activated protein kinase)는 활성화되고 c-Jun은 핵 내로 이동하여 유전자 단백질과 결합한다^{9,24}. c-Jun 또는 Fos가 knockout된 쥐는 파골세포를 형성하지 못해 골경화가 일어나며, 최근 Ikeda 등¹⁴에 의하면 RANKL-TRAF6-MAPKK7-JNK1을 통해 c-Jun이 Fos와 결합하고 이는 NFAT (nuclear factor of activated T cells)를 활성화시킨다고 알려졌다. 본 실험에서는 여러 종류의 마모입자에 의해 NF- κ B 뿐만 아니라 c-Jun/ AP-1도 활성화되어 두 신호전달체계가 마모입자에 의한 파골세포 분화과정에 관여함을 알 수 있었다.

Shanbhag 등²²은 마모입자의 크기, 조성과 표면적에 따라 대식세포의 IL-1, PGE₂ 분비와 골흡수 효과가 다르다고 보고하였다. 본 실험에서 내독소 포함 유무에 따른 추출된 마모입자의 다른 여러 마모입자간의 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 활성화의 정량적 차이를 비교하지 않았으며, 이는 사용된 마모입자의 용량이 달라 활성 능력의 차이를 비교가 불가능하기 때문이었다.

Titanium 입자와 환자에서 추출한 마모입자는 내독소 검사상 양성을 나타내었는데, 내독소는 자체만으로도 파골 세포를 분화 및 활성화시킨다²⁶. 인공관절 주위 골용해에서 내독소의 역할에 대해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았으나, Cho 등⁶은 내독소의 마모입자 부착은 대식세포의 TNF- α IL-1 β 와 IL-1 α 의 생성을 크게 증가시킨다고 하였고, 본 실험에서 추출한 마모입자의 내독소 양성 소견과 이를 제거 시 NF- κ B와 c-Jun/AP-1의 생물학적 활성도가 약 40% 감소하였다는 결과는 의미있는 것으로 볼 수 있다. 다만, 인공관절 주위 골용해의 생물학적 발생기전을 밝히기 위해 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 이외의 다른 경로를 통한 마모입자의 파골세포 분화과정과 최근 밝혀진 NFAT의 역할에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

다양한 조성과 크기의 여러 마모입자들은 파골 전구세포에서 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 신호전달체계(signaling

pathway)를 활성화시켰으며, 특히 실패한 인공관절 환자에
서 추출된 마모입자도 두 전사 인자의 DNA binding activity
를 증가시키는 것으로 나타나, 마모입자에 의한 인체의 인공
관절 주위 골용해 발생기전에 NF- κ B와 c-Jun/AP-1 신호전
달체계는 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Abu-Amer Y, Ross FP, McHugh KP, Livolsi A, Peyron JF and Teitelbaum SL: Tumor necrosis factor- α activation of Nuclear transcription factor- κ B in marrow macrophages is mediated by c-src tyrosine phosphorylation of I κ B α . *J Biol Chem*, 273: 29417-29423, 1998.
- 2) Akisue T, Bauer TW, Farver CF and Mochida Y: The effect of particle wear debris on NF- κ B activation and pro-inflammatory cytokine release in differentiated THP-1 cells. *J Biomed Mater Res*, 59: 507-515, 2002.
- 3) Bi Y, Motter RV, Ragab AA, Goldring VM, Anderson JM and Greenfield EM: Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts. *J Bone Joint Surg*, 83A: 501-508, 2001.
- 4) Chen F, Castranova V and Shi X: New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol*, 159: 387-397, 2001.
- 5) Childs LM, Paschalis EP, Xing L, et al.: In vivo RANK signaling blockade using the receptor activator of NF- κ B:Fc effectively prevents and ameliorates wear debris-induced osteolysis via osteoclast depletion without inhibiting osteogenesis. *J Bone Miner Res*, 17: 192-199, 2002.
- 6) Cho DR, Shanbhag AS, Hong CY, Baran GR and Goldring SR: The role of absorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res*, 20: 704-713, 2002.
- 7) Clohisy JC, Teitelbaum S, Chen S, Erdmann JM and Abu-Amer Y: Tumor necrosis factor- α mediates polymethylmethacrylate particle-induced NF- κ B activation in osteoclast precursor cells. *J Orthop Res*, 20: 174-181, 2002.
- 8) Clohisy JC, Hirayama T, Frazier E, Han SK and Abu-Amer Y: NF- κ B signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res*, 22: 13-20, 2004.
- 9) Curran T and Fianza BRJ: Fos and Jun. The AP-1 connection. *Cell*, 55: 395-397, 1988.
- 10) Decking R, Reuter P, Hutter M, Puhl W, Claes E and Scharf P: Surface composition analysis of failed cementless CoCr- and Ti-base-alloy total hip implants. *J Biomed Mater Res*, 64B: 99-106, 2003.
- 11) Granchi D, Ciapetti G, Amato I et al.: The influence of alumina and ultra-high molecular weight polyethylene particles on osteoblast-osteoclast cooperation. *Biomaterials*, 25: 4037-4045, 2004.
- 12) Harris WH: The problem is osteolysis. *Clin Orthop*, 311: 46-53, 1995.
- 13) Howling GI, Barnett PI, Tipper JL, Stone MH, Fisher J and Ingham E: Quantitative characterization of polyethylene debris isolated from periprosthetic tissue in early failure knee implants and early and late failure Chanley hip implants. *J Biomed Mater Res*, 58: 415-420, 2001.
- 14) Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, et al.: Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest*, 114: 475-484, 2004.
- 15) Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck MA, Hallab NJ and Glant TT: Osteolysis. Basic science. *Clin Orthop*, 393: 71-77, 2001.
- 16) Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93: 165-176, 1998.
- 17) Margevicius KJ, Bauer TW, McMahon JT, Brown SA and Merritt K: Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg*, 76A: 1664-1675, 1994.
- 18) Mercurio F and Manning AM: Multiple signals converging on NF- κ B. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 226-232, 1999.
- 19) Mordmuller B, Krappmann D, Wegener E and Scheidereit C: Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- κ B p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO*, 4: 82-97, 2003.
- 20) Ragab AA, Motter RV, Lavish SA, et al.: Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J Orthop Res*, 17: 803-809, 1999.
- 21) Schwartz EM, Lu AP, Goater J, et al.: Tumor necrosis factor- α /Nuclear transcription factor- κ B signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res*, 18: 472-480, 2000.
- 22) Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO and Glant TT: Macrophage/particle interactions: Effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res*, 28: 81-90, 1994.
- 23) 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.
- 24) Shaulian E and Karin M: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biol*, 4: E131-136, 2002.
- 25) Soloviev A, Schwartz EM, Kuprash DV, et al.: The role of p105 protein in NF- κ B activation in ANA-1 murine macrophages following stimulation with titanium particles. *J Orthop Res*, 20: 714-722, 2002.
- 26) Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM and Nagai K: Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α IL-1, and RANKL. *J Cell Physiol*, 190: 101-108, 2002.
- 27) Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Antwerp DV and Miyamoto S: Rel/NF- κ B/I κ B family. Intimate tales of association and dissociation. *Genes Devel*, 9: 2723-2735, 1995.
- 28) Wagner EF: Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis*, 61: 40-42, 2002.

ABSTRACT

Activation of Transcription Factor NF- κ B and c-Jun/AP-1 by Various Compositions of Particles in Osteoclast Precursor Cells

**Yong Sik Kim, M.D.* , Soon Yong Kwon, M.D.† , Suk Ku Han, M.D.,
Jae Young Kwon, M.D., and Nam Yong Choi, M.D.**

Department of Orthopaedic surgery, Kangnam St. Mary's Hospital, St. Mary's Hospital†,
St. Paul's Hospital, The Catholic university of Korea, Seoul, Korea*

Purpose: This study was performed in order to investigate the effects of various particle preparations on NF- κ B and c-Jun/AP-1 activity in osteoclast precursor cells.

Materials and Methods: Osteoclast precursor cells isolated from C57BL mice were treated with PMMA (polymethylmethacrylate) spheres, polystyrene, titanium particles, and retrieved metal particles from failed cementless total hip replacements. NF- κ B and c-Jun/AP-1 DNA binding activities were analyzed using electrophoretic mobility shift assays (EMSA).

Results: Commercially available PMMA and polystyrene spheres routinely showed negativity on endotoxin assays, but titanium particles and retrieved metal particles consistently showed positivity. PMMA spheres, with a maximal response noted at 30 minutes with an optimal concentration of 0.6 mg/ml, were potent stimulator of NF- κ B and c-Jun/AP-1 activity in osteoclast precursor cells. Other particles (polystyrene, titanium, metal retrievals) also activated transcription factor NF- κ B and c-Jun/AP-1 compared to controls. Endotoxin removal from retrieved metal particles diminished the biologic effect by approximately 40%.

Conclusion: Particles of various compositions and sizes (PMMA, polystyrene, titanium, and retrieved metal particles) activated the NF- κ B and c-Jun/AP-1 signaling pathways. This suggests that NF- κ B and c-Jun/AP-1 may have important roles in the pathogenesis of periprosthetic osteolysis.

Key Words: Transcription factor, NF- κ B, c-Jun/AP-1, Particle, Osteoclast precursor cell, Electrophoretic mobility shift assay