교정적 치아 이동시
압박부 치은에서 IL-1β, TNF-α
MMP-9, TIMP-1의 발현

연세대학교 대학원
치 의 학 과
이 태 연

교정적 치아 이동시 압박부 치은에서 IL-1β, TNF-α MMP-9, TIMP-1의 발현

지도 백 형 선 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 7월 일

연세대학교 대학원
치의학과
이 태 연

이태연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 7월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 항상 따뜻한 배려와 아낌없는 지도, 그리고 격려로 이끌어 주신 백형선 지도 교수님께 진심으로 감사드리며, 많은 관심과 조언으로 부족한 논문을 세심하게 살펴주신 김종관 교수님과 이기준 교수님께 깊이 감사드립니다. 교정의로서 거듭날 수 있도록 따뜻한 말씀과 가르침으로 보살펴주신 손병화 교수님, 박영철 교수님, 황충주 교수님, 김경호 교수님, 최광철 교수님, 차정열 교수님께 감사드립니다.

실험부터 논문 집필까지 아낌없는 조언과 도움을 주셨던 임원희 선생님께 감사드리며 좁은 동물실험실에서 함께 고생한 정다미 선생에게도 감사의 마음을 전합니다.

논문이 나오기까지 서로 격려해 주고 조언해 주었던 동기 서승아, 이한아, 정시내,조선미, 조용민, 황우상 선생, 그리고 의국 후배들, 특히 유국호 선생에게 이 자리를 빌어 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 지금까지 항상 사랑과 믿음으로 지켜봐주시고 저를 격려해 주신 부모님과 함께 있어 든든한 동생에게 고마움을 전하며 이 작고 소중한 기쁨을 함께 나누고자 합니다.

2007년 7월 저자 씀

차 례

표 차례 ····· iii

그림 차례 ····· vi

국문 요약 ····· v

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 연구 대상 및 방법 ····· 4

1. 연구 대상 ····· 4

2. 연구 방법 ····· 5

2. 1 실험 장치 설계 ····· 5

2. 2 조직 시편의 채득 ····· 6

2. 3 Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(real-time RT-PCR)을 이용한 조직 시편 분석 ····· 6

2. 3. 1 RNA extraction ····· 6

2. 3. 2 cDNA synthesis ····· 6

2. 3. 3 Real-time RT-PCR ····· 6

2. 3. 4 Quantification using the Standard Curve method ····· 8

2. 4 분석 및 통계 처리 ····· 8

Ⅲ. 연구 결과 ····· 9

1. IL-1β mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정 ····· 9

2. TNF-α mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검

정 ····· 11
3. MMP-9 mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정 ····· 12
4. TIMP-1 mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정 ····· 14

Ⅳ. 고찰 ····· 16

Ⅴ. 결론 ····· 20

참고 문헌 ····· 21
영문 요약 ····· 27

.

표 차례

Table 1. Genes analyzed by quantitative TaqMan PCR ····· 7
Table 2. IL-1β mRNA expression (relative to GAPDH) ····· 9
Table 3. MMP-9 mRNA expression (relative to GAPDH) ····· 12
Table 4. TIMP-1 mRNA expression (relative to GAPDH) ····· 14

그림 차례

Figure 1. Schematic drawing of the experimental model ····· 5
Figure 2. IL-1β mRNA expression (mean ± SEM) ····· 10
Figure 3. MMP-9 mRNA expression (mean ± SEM) ····· 13
Figure 4. TIMP-1 mRNA expression (mean ± SEM) ····· 15

국문요약

교정적 치아 이동시 압박부 치은에서 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1의 발현

치아에 교정력이 가해지면 치주 인대는 압박되고 그 결과 치주 인대 내 혈류의 변화가 생기게 된다. 이러한 변화는 치주 인대 내 세포의 활성화와 cytokine이나 prostaglandin(PG)과 같은 전구 염증성 물질의 분비를 촉진한다. 아직 그 기전이 완벽히 밝혀지지는 않았으나 PGE, Interleukin-1(IL-1)과 같은 물질들이 이런 치아 주위 조직에 영향을 미쳐 골흡수를 야기하고 이에 따라 골개조가 일어남으로써 치아가 이동되는 것으로 알려져 있다.

교정적 치아이동이 IL-1β, Tumor necrosis factor-α(TNF-α), matrix metalloproteinase-9(MMP-9), Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1(TIMP-1)의 mRNA expression에 미치는 영향을 연구하기 위해 생후 9주된 체중 280±10g의 수컷 Wistar rat 10마리(7일군 5마리, 14일군 5마리)를 실험군으로, 3마리를 대조군으로 하여 총 13마리를 실험하였다. Rat의 치은 조직을 실험 표본으로 하였고 real-time RT-PCR을 사용하여 gene transcription 수준에서 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 교정적 치아 이동에 의해 7일군과 14일군의 압박부에서 대조군에 비해 IL-1β mRNA expression의 유의성 있는 증가가 나타났으며 7일군의 압박부와 비교할 때 14일군의 압박부에서 IL-1β mRNA expression은 감소하였다($p<0.05$).
2. TNF-α mRNA expression은 검출되지 않았다.
3. 교정적 치아 이동에 의해 7일군과 14일군의 압박부에서 대조군에 비해 MMP-9 mRNA expression의 유의성 있는 증가가 나타났다($p<0.05$).
4. 교정적 치아 이동에 의해 7일군과 14일군의 압박부에서 대조군에 비해

TIMP-1 mRNA expression의 유의성 있는 증가가 나타났다($p<0.05$).

본 연구의 결과로 교정적 치아 이동시 치은에서 mRNA 수준의 IL-1β, MMP-9, TIMP-1 변화를 알 수 있었다.

핵심 되는 말 : 교정적 치아 이동, Real-time RT-PCR, IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1

교정적 치아 이동시
압박부 치은에서 IL-1β, TNF-α,
MMP-9, TIMP-1의 발현

(지도 교수: **백 형 선**)
연세대학교 대학원 치의학과

이 태 연

Ⅰ. 서론

치아에 교정력이 가해지면 치주 인대는 압박되고 그 결과 치주 인대 내 혈류의 변화가 생기게 된다. 이러한 변화는 치주 인대 내 세포의 활성화와 cytokine이나 prostaglandin(PG)과 같은 전구 염증성 물질의 분비를 촉진한다. Uematsu 등(1996)과 Yamasaki 등(1980)의 실험에서 교정적 치아 이동에 의한 PG, interleukin(IL) 등의 증가가 증명되었다. 아직 교정적 치아이동의 정확한 기전이 완벽히 밝혀지지 않았으나 PGE, IL-1과 같은 물질들이 치아 주위 조직에 영향을 미쳐 골흡수를 야기하고 이에 따라 골개조가 일어남으로써 치아가 이동되는 것으로 알려져 있다.

Saito 등(1990)은 in vitro 상에서 PGE_2에 의해 치주 조직 세포의 골흡수 능력 활성도가 유도된다고 하였으며 Hansch 등(1990)은 PGE_2가 파골세포의 수와 활성

도를 증가시킨다고 하였다. 또한 Massoud 등(2003)은 PG를 실험 동물에 주입함으로써 교정적 치아 이동이 증가됨을 보고하였다.

IL-1은 신경전달물질, 박테리아 생성물, 다른 cytokine, 물리적 힘 등의 다양한 자극에 의해서 분비되며 면역 반응과 급성 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. IL-1은 파골세포의 IL-1 수용체를 통해서 파골세포를 직접 활성화시킨다. Richard 등(1988)은 in vitro 상에서 IL-1이 치주 인대와 치은의 섬유아세포를 자극해 collagenase와 matrix metalloproteinases(MMPs)를 분비한다고 하였다. Davidovitch 등(1988), Alhashimi 등(2001)은 실험을 통해서 교정력에 의한 IL-1β의 증가를 보고하였다.

Tumor necrosis factor-α(TNF-α)는 골흡수 초기에 매개체 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 Bertolini 등(1986)과 Canalis(1987)는 TNF-α가 골흡수와 골세포 복제를 촉진한다고 하였다. Davidovitch 등(1988)은 치아 이동시 치주 인대와 치조골 세포에서 유의성 있는 TNF-α, IL-1β의 증가가 일어난다고 하였으며 Dinarello(1989)는 TNF-α가 IL-1β와 함께 상승 작용을 보인다고 하였다.

MMPs는 collagen과 세포외 기질의 분해에 관여하는 효소이다. Bode 등(2003)은 MMPs를 일반적으로 gelatinases(MMP-2, MMP-9), collagenases(MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelysins(MMP-3, MMP-10, MMP-11), membrane-type MMP(MT1-6 MMPs), 기타 MMP로 분류하였다. 이 중 gellatinases로 분류되는 MMP-2와 MMP-9는 조직의 염증 반응시 나타나고 특히 MMP-9는 골 기질의 collagen과 단백질을 분해하는 파골세포 계통에서 발현되며 치아 이동시 압박부와 장력부에서 나타난다고 보고하였다.

Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases(TIMPs)는 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 이 4가지로 구성되며 MMPs를 억제하는 작용을 담당한다. TIMPs가 MMPs의 활성화부에 결합하여 억제 작용을 한다고 Lambert 등(2004)이 보고하였으며 Cao 등(1995)은 TIMPs가 비활성화된 MMPs에도 결합하여 억제 효과를 나타냄을 보고하였다.

치아 이동시 인간의 치은 열구액에서 TNF-α가 증가된다고 Lowney 등(1995)이 보고하였으며 Uematsu 등(1996)은 IL-1β, IL-6 역시 증가한다고 하였다. 그리고

Lee 등(2004)은 교정력에 의해 IL-1β, PGE_2가 증가함을 보고하였다. Alhashimi 등(2001)은 *in situ* hybidization을 사용하여 교정적 치아 이동이 periodontal ligament에서 IL-1β, IL-6의 증가를 가져온다고 보고하였고 Takahashi 등(2006) 역시 같은 방법으로 교정적 치아 이동이 MMP-2, MMP-9, TIMPs 1-3의 증가를 가져온다고 보고하였다. 이에 본 연구에서는 쥐의 압박부 치은 조직을 실험 표본으로 하여 gene transcription 수준에서 교정적 치아 이동이 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 real-time RT-PCR을 사용한 정량적 분석을 시행하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1.1 대조군 및 실험군

생후 9주된 체중 280±10g의 수컷 Wistar rat 13마리를 연구 대상으로 하였다. 실험동물은 연세대학교 치과대학 동물실험실에서 사육하였으며 공기 정화가 되는 stainless steel cage에 사육하였다. 12시간 간격으로 조명의 명암 주기를 조절하였으며 고형사료(8811M0001, Extrusion, Superfeed Co., LTD, Gangwon, Korea)와 물을 공급하였다.

대조군으로 3마리를 설정하였고 실험군으로 10마리를 설정하였으며 5마리를 7일군으로 지정하여 실험 개시 7일 후 희생시켰고 나머지 5마리를 14일군으로 지정하여 실험 개시 14일 후 희생시켰다. 실험군 내에서 교정력을 가하는 상악 좌측 제 1 대구치 근심측 치은을 압박부로, 교정력을 가하지 않는 상악 우측 제 1 대구치 근심측 치은을 대측성부로 설정하였다.

2. 연구 방법

2. 1 실험 장치 설계

실험 동물의 상악 좌측 제 1 대구치를 근심 이동시키기 위해서 closed open coil spring(Sentalloy, 0.009 x 0.036, Tomy Incorporated, Tokyo, Japan)을 사용하여 20g의 지속적인 힘을 발생시켰다. Stainless steel wire를 사용하여 spring을 상악 좌측 제 1 대구치와 상악 양측 전치 사이에 결찰하였다(Figure 1). 상악 좌측 제 1 대구치의 근심 설측 선각부에서 원심 설측 선각부에 이르는 치경 부위와 상악 양측 전치의 원심 경부에 diamond bur로 홈을 형성한 후에 광중합 접착제(3M Unitek, Nonrovia, CA 91016, USA)를 적용하여 장치의 유지력을 증가시켰다. 실험 동물의 체중은 장치 장착시와 희생시 측정되었다. 모든 실험 과정은 Zoletil(Tiletamine 125 ml, Zolazepam 125 ml Virbac, 060516 carros, France 0.04ml)과 Rompun(Xylazire hydroxychloride 23.32mg/1ml, 2036D, Bayer AG, 51368 Leverkusen, German 0.01ml)을 사용한 피하 주사에 의해 유도된 전신 마취 하에서 이루어졌다.

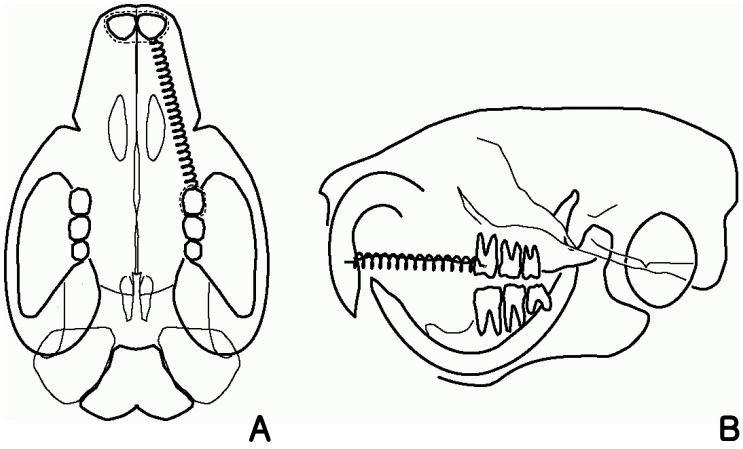


Figure 1. Schematic drawing of the experimental model. A closed coil spring was connected between the maxillary first molar and the maxillary incisors. (A) occlusal view, (B) sagittal view

2. 2 조직 시편의 채득

각 실험 단계 완료시 전술한 마취약을 과량 투여하여 실험동물을 안락사 시켰다. 상악 양측 제 1 대구치 근심측 치은을 절제하고 cryotube에 밀폐한 후 액체 질소를 사용하여 - 80℃ 하에 보관하였다.

2. 3 Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction(real-time RT-PCR)을 이용한 조직 시편 분석

2. 3. 1 RNA extraction

TRI zol®(Molelular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)을 사용하여 각 절제한 치은 조직의 total RNA를 추출하였다.

2. 3. 2 cDNA synthesis

Promega's Reverse Transcription system(Promega Corp., Madison, WI, USA)을 사용하여 1㎍의 total RNA를 cDNA로 역전사시켰다. RT POX buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, Oligo (dT) primer, dNTP Mix, Rnasin이 포함된 혼합물에 reverse transcriptase를 추가하였다. 반응물은 42℃ 하에서 15분간 보관한 후 95℃에서 5분간 가열하였다.

2. 3. 3 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR은 ABI Prism 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. Primer와 IL-1β,

TNF-α, MMP-9, TIMP-1의 probe는 Table 1에 정리되어 있다. 제조자 지시에 따르면 PCR 증폭은 50ng cDNA sample, 1X TaqMan Universal PCR Master Mix, 300 nM of each primer, 250 nM TaqMan probe를 포함하는 총 25 ㎕의 용액 하에서 일어난다. 초기 열 사이클 조건은 50℃에서 시작 2분간 유지 후 95℃에서 10분간 유지하는 것이며 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1에 대한 사이클 조건은 95℃에서 15초 유지 후 60℃에서 1분간 유지하는 것이다. Real-time PCR에서 fluorescence 표시자로써 6-carboxyfluorescein으로 식별된 oligonucleotide hybridazation probe와 quencher fluorescence의 역할을 하는 6-carboxy -tetramethy-rhodamine이 사용되었다.

Table 1. Genes analyzed by quantitative TaqMan PCR

Gene	Primer/probe	Sequence
IL-1β	Forward primer	5′-CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G-3′
	Reverse primer	5′-GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA-3′
	Probe	5′-CTG TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC CAC C-3′
TNF-α	Forward primer	5′-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3′
	Reverse primer	5′-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3′
	Probe	5′-CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG GA-3′
MMP-9	Forward primer	5′-CGA ACT TCG ACA CTG ACA AGA AGT-3′
	Reverse primer	5′-GCA CGC TGG AAT GAT CTA AGC-3′
	Probe	5′-TCT GTC CAG ACC AAG GGT ACA GCC TGT TC-3′
TIMP-1	Forward primer	5′-CAT GGA AAG CCT CTG TGG ATA TG-3′
	Reverse primer	5′-AAG CTG CAG GCA CTG ATG TG-3′
	Probe	5′-CTC ATC ACG GGC CGC CTA AGG AAC-3′

Probes contain a FAM on the 5′ end and a TAMRA on the 3′ end.

2. 3. 4 Quantification using the Standard Curve method

결과의 정량분석에 있어서 이미 알려진 cDNA fragment가 기준으로 설정되었다. Standard Curve method를 이용하여 GAPDH mRNA 양과 cytokine의 mRNA level을 측정하였다. 결과는 GAPDH mRNA의 양을 이용하여 보정하였다. 각 시료에서 mRNA의 수준은 대조군에 대한 비율로 표현되었다. 모든 시료는 3배로 계산하여 측정하였다.

2. 4 분석 및 통계 처리

측정치는 Wilcoxon test를 통해 분석하였으며 mean ± standard error mean(SEM)으로 표현되었다. $p\text{-value}<0.05$ 수준에서 통계학적 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. IL-1β mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정

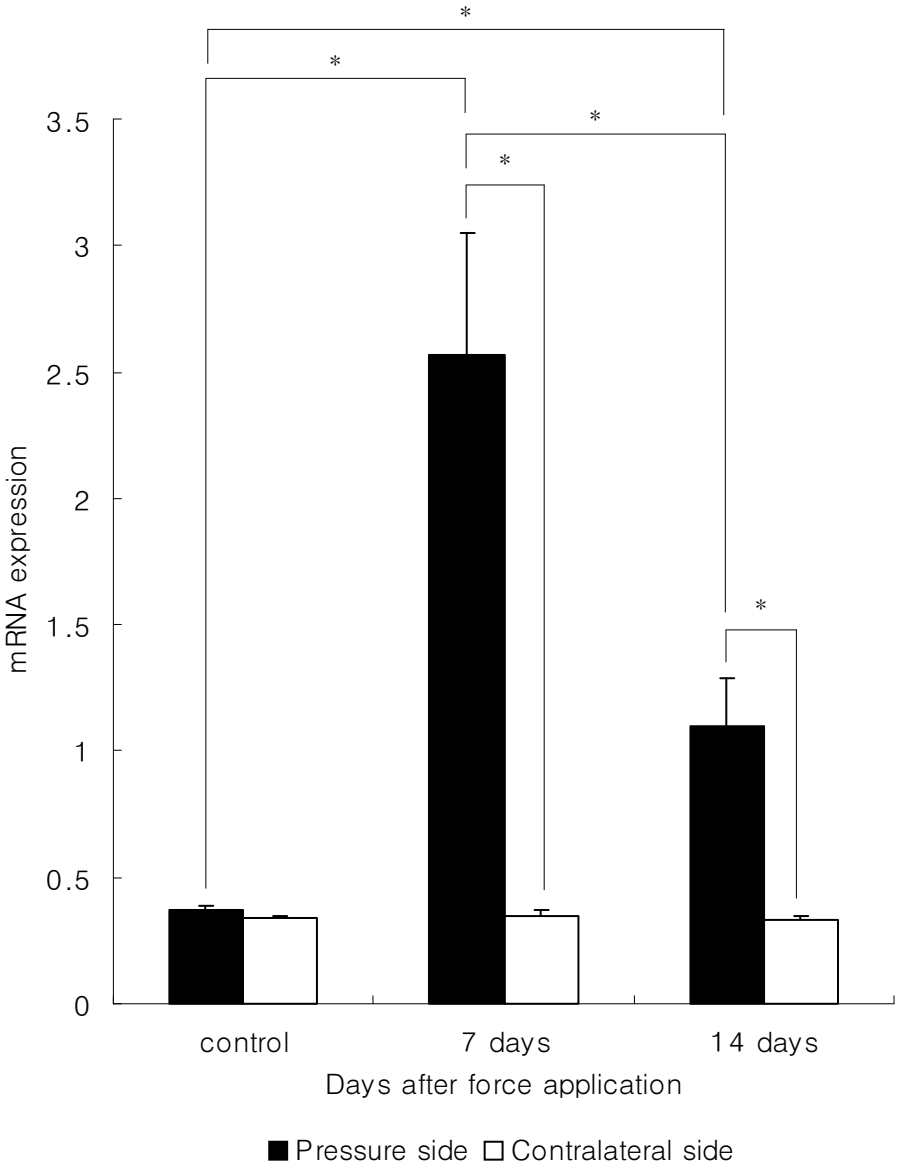
교정력 적용 7일 후와 14일 후 모두에서 압박부의 IL-1β mRNA expression이 대측성부에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. 압박부의 14일 후 IL-1β mRNA expression은 7일 후에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 2, Figure 2).

Table 2. IL-1β mRNA expression (relative to GAPDH)

	Pressure side		Contralateral side		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Sig.
control	0.37	0.02	0.34	0.01	NS
7 days	2.57	0.48	0.35	0.02	*
14 days	1.10	0.19	0.33	0.02	*

* : $p<0.05$, NS: not significant

Figure 2. IL-1β mRNA expression (mean ± SEM)



2. TNF-α mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정

교정력 적용 7일 후와 14일 후 압박부와 대측성부, 그리고 대조군 모두에서 TNF-α mRNA expression이 검출되지 않았다.

3. MMP-9 mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정

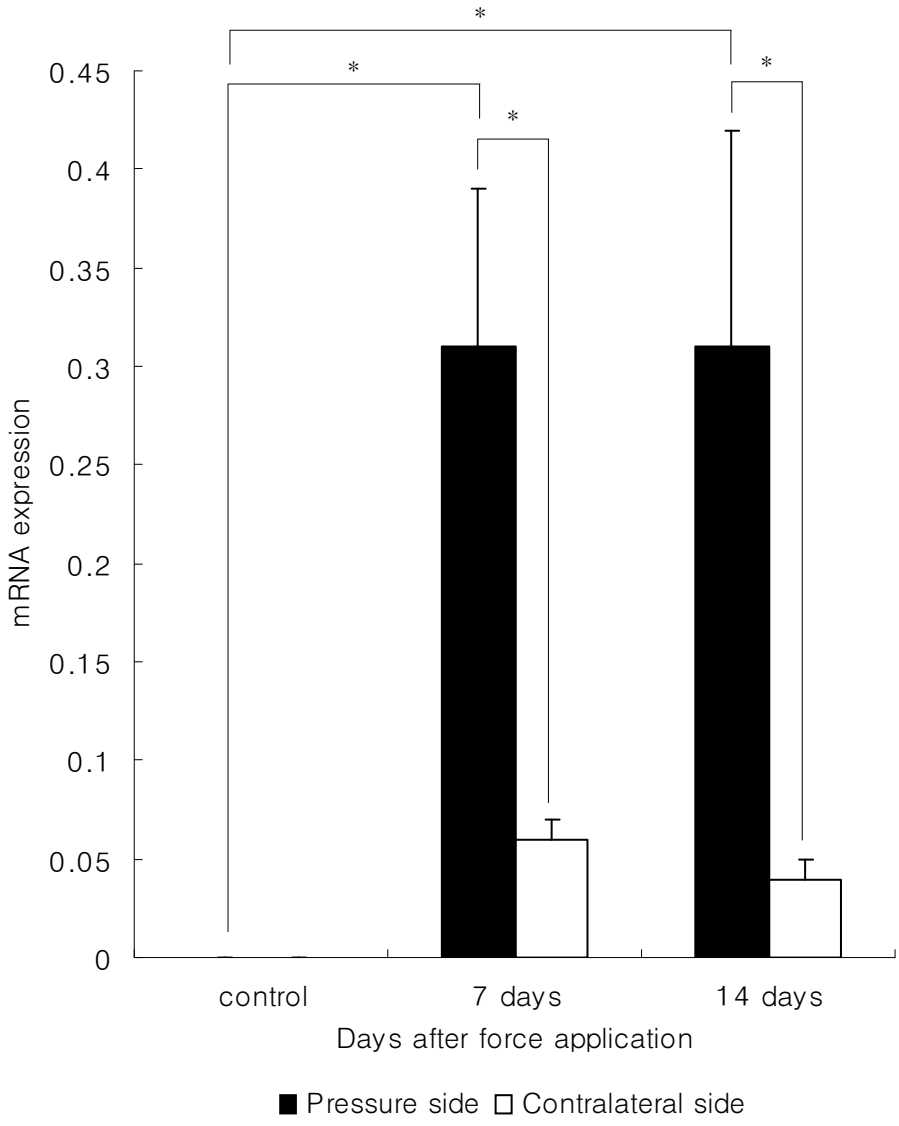
교정력 적용 7일 후와 14일 후 모두에서 압박부의 MMP-9 mRNA expression이 대측성부에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Table 3, Figure 3).

Table 3. MMP-9 mRNA expression (relative to GAPDH)

	Pressure side		Contralateral side		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Sig.
control	0.00	0.00	0.00	0.00	NS
7 days	0.31	0.08	0.06	0.01	*
14 days	0.31	0.11	0.04	0.01	*

* : $p<0.05$, NS: not significant

Figure 3. MMP-9 mRNA expression (mean ± SEM)



4. TIMP-1 mRNA expression에서 압박부, 대측성부의 차이에 대한 유의차 검정

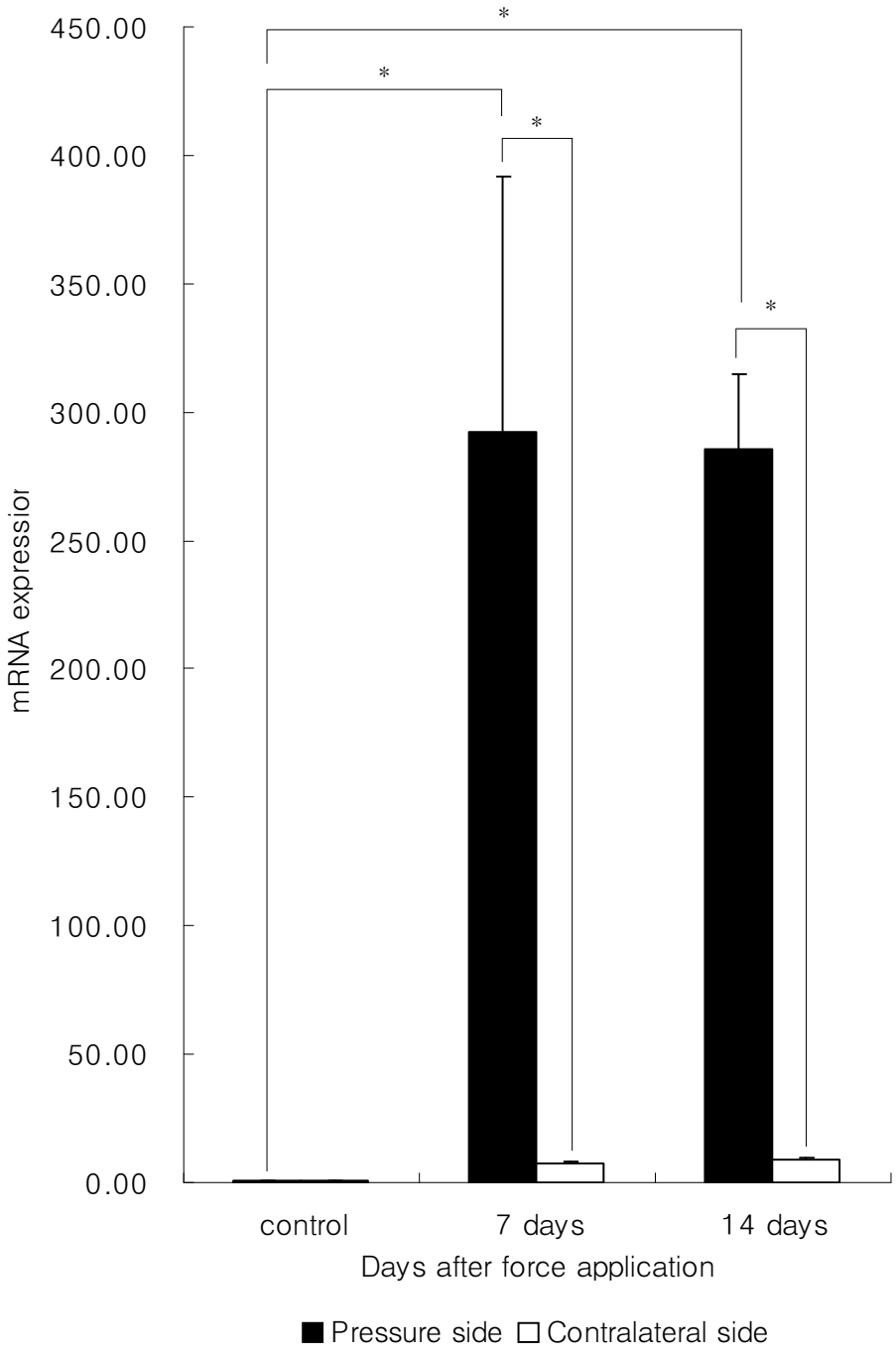
교정력 적용 7일 후와 14일 후 모두에서 압박부의 TIMP-1 mRNA expression이 대측성부에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. (Table 4, Figure 4).

Table 4. TIMP-1 mRNA expression (relative to GAPDH)

	Pressure side		Contralateral side		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Sig.
control	0.42	0.02	0.38	0.01	NS
7 days	292.48	99.12	7.16	0.75	*
14 days	285.38	29.08	9.11	0.68	*

* : $p<0.05$, NS: not significant

Figure 4. TIMP-1 mRNA expression (mean ± SEM)



Ⅳ. 고찰

본 연구에서 교정적 치아 이동에 의한 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1의 변화를 알아 본 결과 압박측 치은에서 IL-1β mRNA expression은 유의성 있는 증가 양상을 보였으나 TNF-α mRNA는 검출되지 않았다. 또한 MMP-9과 TIMP-1의 mRNA expression은 유의성 있게 증가함을 관찰할 수 있었다.

Lowney 등(1995)과 Uematsu 등(1996)은 치아에 대한 교정력의 적용이 치은 열구에서 전구 염증성 cytokine을 증가시킨다고 보고하였으며 이들 연구에서는 치은 열구액에서 나타난 전구 염증성 cytokine의 변화를 관찰하였다. 그렇기 때문에 위 연구에서 보고한 cytokine 변화가 유전자 전사 수준에서 일어났는지 아니면 유전자 번역 수준에서 일어났는지 판별할 수가 없다. Alhashimi 등(2001)과 Takahashi 등(2006)은 *in situ* hybidization을 사용하여 교정적 치아 이동이 periodontal ligament에서 각각 IL-1β, IL-6의 증가와 MMP-2, MMP-9, TIMPs 1-3의 증가를 가져온다고 보고하였다. 그러나 *in situ* hybidization은 정량적인 면에 있어서 정확성이 떨어지는 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 쥐의 압박부 치은 조직을 실험 표본으로 하여 gene transcription 수준에서 교정적 치아 이동이 IL-1β, MMP-9, TIMP-1에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 real-time RT-PCR을 사용한 정량적 분석을 시행하고자 한다.

본 실험에서는 gene transcription 수준에서 관찰하기 위해 mRNA의 변화를 측정하기로 하였다. 현재 mRNA의 변화를 정량화하기 위해 사용되는 방법에는 northern blotting, *in situ* hybridization, cDNA array, RT-PCR 등 여러 가지가 있다. 그중에서도 RT-PCR을 이용할 경우 mRNA 수준에서 매우 낮은 양의 cytokine도 검출할 수 있기 때문에 RT-PCR이 정량분석에 있어서 가장 민감하고 정확한 방법이라고 할 수 있다. RT-PCR은 quantitative RT-PCR, semiquantitative RT-PCR, real-time RT-PCR로 나누어지는데 그 중에서 real-time RT-PCR은 실시간으로 PCR product를 정량화할 수 있으며 가장 빠르게 결과를 도출해내는 장점을 가진다.

본 실험 과정에서 7일군의 rat 한 마리는 실험 장치 장착을 위한 전신마취 후 죽었으며 14일군의 rat 한 마리에서는 실험 장치가 탈락되어 이 두 마리를 결과에서 제외시켰다.

IL-1은 α와 β 두 가지 형태로 존재하는데 Gowen 등(1983), Heath 등(1985), Stashenko 등(1989)은 IL-1β가 골 대사, 골 흡수 촉진, 골 형성 억제에 중요한 역할을 한다고 하였으며 염증 과정에서 주된 역할을 담당하고 있다고 하였다. IL-1β는 주로 대식 세포, 내피 세포, 섬유아세포 등에 의해 분비된다. Davidovitch 등(1988)은 고양이를 이용한 실험에서 견치에 교정력을 가한 후 치아 이동 초기에 치주 조직에서 IL-1β가 증가하는 것을 증명하였다. 그리고 Alhashimi 등(2001)은 rat을 사용한 실험에서 *in situ* hybridization을 사용하여 교정력에 의해서 periodontal ligament의 IL-1β가 증가함을 보고하였다.

본 실험에서 7일군, 14일군 모두에서 대측성부에 비해서 압박부의 IL-1β mRNA expression이 유의성 있는 증가를 나타냄을 알 수 있었다. 실험시작 전 압박부와 대측성부의 IL-1β mRNA expression은 통계학적으로 유의성 있는 차이가 없었다. 실험시작 전 압박부에 비해 7일군의 압박부의 IL-1β mRNA expression은 유의성 있는 증가를 나타냈으며 7일군의 압박부에 비해 14일군의 압박부의 IL-1β mRNA expression은 유의성 있는 감소를 나타냈는데 14일군의 IL-1β mRNA expression은 7일군의 절반 이하로 감소했다. 이런 현상이 나타나는 이유 중 하나는 장치 장착 이후에 재활성화를 시행하지 않았기 때문이다. 또한 Iwasaki 등(2000)은 연속적인 교정력 하에서 치은열구액의 IL-1β가 28일 주기의 진동을 가진다고 보고하였는데 교정력으로 가해졌을 때 3일 내에 IL-1β의 분비량이 최고치를 나타내며 계속 감소하다가 28일을 기점으로 다시 증가하는 양상을 나타낸다고 하였다. 이것이 본 연구에서 IL-1β mRNA expression이 7일군의 압박부에 비해 14일군에서 감소한 다른 이유이다.

Canalis 등(1991), Saito(1990) 등은 TNF-α가 골 흡수의 초기 조절자로서 중요한 역할을 한다고 하였으며 Rossomando 등(1990)은 TNF-α가 치은 열구액에서 검출되었다고 보고하였다. 그리고 Lowney 등(1995)은 인간의 치은 열구액을 대상으로 실험한 결과로 교정적 치아 이동이 단백질 수준에서 TNF-α의 증가를 가져

온다고 보고하였다.

그러나 본 실험 결과 7일군과 14일군의 압박부, 대측성부 그리고 대조군 모두에서 mRNA 수준에서의 TNF-α가 검출되지 않았다. 여기에 대해서는 추가적인 연구와 검증이 필요하다.

Collagen과 세포외 기질의 분해에 관여하는 효소인 MMPs 중에서 gellatinase로 분류되는 MMP-2와 MMP-9는 조직의 염증 반응시 나타난다고 Distler 등(2005), Itoh 등(2002)은 보고하였다. MMP-2와 MMP-9는 치아 이동시 압박부와 장력부에서 발견되며 collagen의 분해와 관계가 있다. 특히 MMP-9는 골 기질의 collagen과 단백질을 분해하는 파골세포 계통에서 발현되며 치아 이동시 압박부와 장력부에서 나타난다고 Reponen 등(1994)이 보고하였다.

7일군과 14일군 모두에서 대측성부에 비해 압박부의 MMP-9 mRNA expression이 유의성 있는 증가를 나타내었다. Takahashi 등(2006)은 쥐를 이용한 실험에서 *in situ* hybridization을 사용하여 교정력이 실험 시작 7일 후 압박부 periodontal ligament의 MMP-9 mRNA expression을 증가시킨다고 보고하였으며 실험 시작 14일 후에는 교정력이 가해지기 전 수준으로 감소한다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 7일군과 14일군의 압박부 MMP-9 mRNA expression이 유의성 차이를 보이지 않았다.

TIMPs는 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 이 4가지로 구성된다. 그 중 TIMP-1과 TIMP-2는 대부분의 MMPs를 억제할 수 있는 효과를 가지며 TIMP-1은 fibroblast-derived MMPs에 대한 강한 억제 효과를 보이는데 반해 TIMP-2는 Polymorphonuclear leukocyte-derived MMPs(MMP-8, MMP-9)에 대한 강한 억제 효과를 보여준다고 Kubota 등(1997)이 보고하였다. 그리고 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3은 다양한 세포에서 표현되는데 반해서 TIMP-4는 특정 조직에서만 표현된다고 하였다. TIMPs의 MMPs 억제 효과는 TIMPs가 MMPs의 활성화부에 결합함으로써 나타난다고 Lambert 등(2004)이 보고하였으며 TIMPs는 비활성화된 MMPs에도 결합하여 억제 효과를 나타낼 수도 있다. Cao 등(1995)은 TIMP-1이 proMMP-2에 결합하여 억제 효과를 나타내며 TIMP-3이 proMMP-2, proMMP-9에 결합하여 억제 효과를 나타낸다고 하였다.

본 연구의 7일군과 14일군 모두에서 대측성부에 비해 압박부의 TIMP-1 mRNA expression은 통계학적으로 유의성 있게 증가하였다. 그러나 7일군과 14일군의 압박부 TIMP-1 mRNA expression은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. Redlich 등(2001)은 개를 이용한 실험에서 semiquantitative RT-PCR을 사용하여 교정력의 적용이 치은에서 TIMP-1을 증가시킨다고 하였고 교정력 적용 후 1주일과 2주일 간의 차이는 없다고 보고하여 본 실험 결과와 동일하였다. 교정력에 의해 치주 인대 내에서 변화가 일어나고 이에 따라 활성화된 MMP-9의 양이 증가하게 되며 미세하게 조정되는 feedback system이 작동하게 된다. 그래서 MMPs의 활성을 억제하는 mRNA TIMP-1 expression이 증가하게 된 것이라고 설명할 수 있다.

본 연구의 목적은 교정적 치아 이동이 gene transcription 수준에서 압박측 치은의 IL-1β, TNF-α MMP-9, TIMP-1에 어떤 영향을 주는지 정량적으로 평가하는 것이었다. 실험 결과 압박부 치은에서 IL-1β, MMP-9, TIMP-1 mRNA expression이 유의성 있는 증가를 나타내었다. 그리고 TNF-α mRNA expression은 검출되지 않았다. 본 연구에서는 실험 개시 후 1주와 2주에 실험동물을 희생시켜 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1의 변화를 관찰하였으나 보다 정확한 추이를 관찰하기 위해서는 이 시간 간격이 다소 긴 것으로 사료된다. 그리하여 관찰 간격을 줄이고 총 관찰 시간을 증가시키는 연구가 필요하며 교정적 치아 이동에 영향을 미치는 다른 변수를 포함하는 추가적인 연구가 앞으로 필요할 것으로 생각된다.

Ⅳ. 결론

생후 9주된 체중 280±10g의 수컷 Wistar rat 10마리(7일군 5마리, 14일군 5마리)를 실험군으로, 3마리를 대조군으로 하여 총 13마리를 실험에 사용하였으며 교정적 치아이동이 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1의 mRNA expression에 미치는 영향을 연구하였다. Rat의 치은 조직을 실험 표본으로 하였고 real-time RT-PCR을 사용하여 gene transcription 수준에서 IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 교정적 치아 이동에 의해 7일군과 14일군의 압박부에서 대조군에 비해 IL-1β mRNA expression의 유의성 있는 증가가 나타났으며 7일군의 압박부와 비교할 때 14일군의 압박부에서 IL-1β mRNA expression은 감소하였다($p<0.05$).
2. TNF-α mRNA expression은 검출되지 않았다.
3. 교정적 치아 이동에 의해 7일군과 14일군의 압박부에서 대조군에 비해 MMP-9 mRNA expression의 유의성 있는 증가가 나타났다($p<0.05$).
4. 교정적 치아 이동에 의해 7일군과 14일군의 압박부에서 대조군에 비해 TIMP-1 mRNA expression의 유의성 있는 증가가 나타났다($p<0.05$).

본 연구의 결과로 교정적 치아 이동시 치은에서 mRNA 수준의 IL-1β, MMP-9, TIMP-1 변화를 알 수 있었다.

참고 문헌

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2001;119:307-312.

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. Nature 319:516-518.

Bode W, Maskos K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. Biol Chem 384:863 - 872.

Canalis E. Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro. Endocrinology 121:1596-1604.

Canlis E, McCarthy TL, Centrella M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. Ann Rev Med 42 (1991), pp. 17 - 24.

Carlos F, Cobo J, Diaz-Esnal B, Arguelles, Vijande M, Costales M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooygenase-2. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006;129:402-6.

Davidovitch Z, Tooth movement. Crit Rev Oral Biol Med 2(1991), pp. 411 - 450.

Davidovitch Z, Nicolay O, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. Dent Clin North Am 1988;32:411-35.

Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines, Adv Immunol 44:153-205.

Engebreston SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCR Il-1 profiles in periodontal disease. J Clin Periodontol 2002;29:48-53.

Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, di Giovine FS, Kornman KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. J Periodontol 1999;70:567-573.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An Overview of Real-Time quantitative PCR: Applications to quantify cytokines gene expression. Methods 2001;25:386-401.

Grieve WG 3rd, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E(PGE) and interleukin-1 beta(IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1994 Apr;105(4):369-74.

Hansch C, Sammes P.G, Taylor J.B. Comprehensive medical chemistry. (1st ed.), Pergamon Press, Oxford (1990).

Hayashi H, Konoo T, Yamaguchi K. Intermittent 8-hour activation in orthodontic molar movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125:302-309.

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin - 1 and tumor necrosis factor-α, but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone 1999;25:255-9.

Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of Matrix Metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. J Dent Res 2003;82(9): 687-691.

Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1β and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. Arch Oral Biol. 2001 Feb;46(2):185-9.

Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006;129:469e.1-32.

Kubota T, Matsuki Y, Nomura T, Hara K. In situ hybridization study on tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs) mRNA-expressing cells in human inflamed gingival tissue. J Periodontal Res. 1997 Jul;32(5):467-72.

Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. Crit Rev Oncol Hematol 49:187 - 198.

Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1 and prostaglandin E_2 production in gingival crevicular fluid. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125:168-177.

Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab Invest 1987;56:234-48.

Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor α in the human gingival sulcus. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1995;108:19-24.

Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ. Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures in vitro. Calcif Tissue Int 1980;30:77-82.

Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, Nielsen LS, Svejgaard A, Nerup J. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences J. Scand J Immunol 1988;27:705-716.

Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S, Palmon A. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. J Dent Res. 2001 Dec;80(12):2080-4.

Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. Eur J Orthod 2004;26:483-490.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. J Cell Biol 124:1091 - 1102.

Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. Arch Oral Biol 33, 237 - 243.

Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans, Arch Oral Biol 35 (1990), pp. 431 - 434.

Saito S, Ngan P, Saito M, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interactive effects between cytokines on PGE production by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. J Dent Res. 1990;69:1456-62.

Takahashi I, Nishimuara M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y, Mitani H. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. J Dent Res 2003;82(8):646-651.

Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. J Mol Histol. 2006 Nov;37(8-9):333-42. Epub 2006 Oct 17.

Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin-1, IL-6, Tumor necrosis factor-α, epidermal growth factor, and β_2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. J. Dent Res 1996;75(1):562-567.

Vieleck J, Lee TH. Tumor necrosis factor, new insights into the molecular mechanisms of its actions. J Biol Chem 266 (1991), pp. 7313 - 7316.

Yamasaki K, Shibata Y, Imai S, Tani Y, Shibasake Y, Fukuhara T. Clinical application of prostaglandin E upon orthodontic tooth movement. AM J Orthod 1984;85:508-18.

Abstract

Expression of IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1 in the pressure side of gingiva under orthodontic loading

Tae-Yeon Lee

Department of Dentistry
The Graduate School, Yonsei University
(Directed by Professor Hyoung-Seon Baik, D.D.S., Ph.D.)

After the application of orthodontic force, the compressed periodontal ligament(PDL) changes the blood supply of the PDL capillaries. Cells in the PDL are activated and pre-inflammatory molecules like cytokine and prostaglandin(PG) are secreted as a result of the environmental change. The mechanism of tooth movement is not proved clearly, but molecules like PGE and IL-1 effect periodontal tissue and induce bone resorption and bone deposition. This bone remodeling makes orthodontic tooth movement now possible.

Thirteen Wistar male rats(weight, 280±10g) that were 9 weeks old were used in this study. The rats were divided into 3 groups according to observation time; 7 days group, 5 rats; 14 days group, 5 rats; control group, 3 rats. After application of orthodontic force, the gingivae of the pressure side and contralateral side were excised. The mRNA levels of IL-1β, TNF-α, MMP-9, and TIMP-1 were detected by real-time RT-PCR.

1. In the 7 days group and 14 days group, IL-1β mRNA expression of the pressure side was increased($p<0.05$). Compared to the pressure side in the 7 days group, IL-1β mRNA expression of the pressure side in the 14 days group was decreased($p<0.05$).

2. TNF-α mRNA expression was not detected.

3. In the 7 days group and 14 days group, MMP-9 mRNA expression of the pressure side was increased($p<0.05$).

4. In the 7 days group and 14 days group, TIMP-1 mRNA expression of the pressure side was increased($p<0.05$).

The results of this study indicate that the mRNA levels of IL-1β, MMP-9, and TIMP-1 change in the pressure side of gingiva under orthodontic loading.

Key words : Orthodontic tooth movement, Real-time RT-PCR, IL-1β, TNF-α, MMP-9, TIMP-1