

# 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 가 치주인대 섬유아세포의 collagenase와 TIMP-1의 발현에 미치는 영향\*

김 명 립<sup>1)</sup> · 배 창<sup>2)</sup>

교정력이 치아에 가해지면 치주인대의 재생과 치조골의 개조가 일어난다. 치주인대 섬유아세포는 collagenase와 TIMP-1을 분비하여 치주조직의 교원질의 분해와 합성을 담당한다. 본 연구에서는 치주인대 섬유아세포에 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 가해 collagenase와 TIMP-1의 발현을 RT-PCR과 면역조직화학 염색을 사용하여 알아보았다. 4명의 10대 남자 교정환자에게서 아무런 병소가 없는 제1소구치를 발치후 치주인대 섬유아세포를 배양하여 4-6세대의 세포를 사용하였다. 대조군, Petriperm dish<sup>®</sup> 바닥의 표면적을 5% 증가시킨 기계적 자극을 가한 군, interleukin-1 $\beta$ 를 1.0 ng/ml를 가한 군과 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 가한 군으로 나누어 4명의 환자에서 얻은 세포군을 각 군별로 2, 4, 8시간 후 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 반정량하여 대조군에 대한 각 실험군의 상대적인 증감을 나타내었고, 24시간후 면역조직화학 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 광학 현미경으로 세포의 형태를 관찰한 결과 대조군에서는 전형적인 별모양과 길쭉한 모양을 함께 보였으나 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서는 별모양의 세포가 사라지고 모양이 더욱 길어졌다.
2. collagenase는 대조군에 비해 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서 증가하였고, 실험 8 시간 후에는 interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 동시에 준 군에서 뚜렷한 증가를 보였다.
3. TIMP-1은 세포 자극 2, 4시간 후에는 대조군에 비해 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서 감소하였지만, 실험 8 시간 후에는 증가를 보였다.
4. 면역조직화학 염색을 통해 collagenase와 TIMP-1이 대조군에 비해 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서 더욱 강한 염색상을 나타내었다.

본 실험의 결과 섬유아세포는 외부 자극이 가해지면 collagenase와 TIMP-1의 발현 조절을 통해 치주인대 재생과 치조골의 개조에 영향을 미쳐 항상성을 유지하려고 함을 알 수 있었다.

( 주요단어 : 기계적 자극, interleukin-1 $\beta$ , collagenase, TIMP-1 )

## 1. 서 론

치아에 가해진 외부 기계적 자극(교정력)이 결합 조직 세포에 일으키는 반응은 최근 교정학 분야의 큰

관심이 되어오고 있다. 교정력이 치주조직에 일으키는 반응은 크게 치주인대의 재생과 치조골의 개조로 나뉘어진다. 치주인대는 백악질과 치조골 사이의 결합조직으로 구성되며, 치조와내에서 치아를 지지해주고 치아에 가해지는 힘에 일차적으로 반응한다. 또한 치주인대는 빠른 분열과 분화 등의 활동성에 의해 역동적인 반응을 보이는데, 특히 교원질이 끊임없이 생합성되고 제거되어 대치된다<sup>17)</sup>. 이러한 교체는 치주

\* 본 논문은 가톨릭대학교 성 바오로 병원 임상의학연구비로 지원되었음.

<sup>1)</sup> 가톨릭대학교 치과학교실 교정과 전임강사대우

<sup>2)</sup> 가톨릭대학교 치과학교실 교정과 교수

인대의 주된 세포인 섬유아세포가 matrix metalloproteinase의 일종인 collagenase (matrix metalloproteinase-1 : MMP-1)와 이의 억제물질인 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)을 분비하여 이루어지고<sup>3)</sup>, 활성화된 collagenase는 TIMP-1과 1:1로 복합체를 형성하고 복합체를 형성하지 않은 collagenase가 교원질의 분해를 담당하게 되어 collagenase와 TIMP-1 사이의 균형이 치주조직의 개조와 분해를 조절한다<sup>13)</sup>. 한편 치주인대내 섬유아세포는 외력에 대해 다양한 반응을 보임으로써 치조골의 개조에도 관여를 한다. Roberts와 Chase<sup>14)</sup>는 치주인대 세포에 교정력을 가하면 세포가 증식하면서 조골세포로 분화하며, 교정력에 의해 발생된 조골세포는 주로 인접 치주인대내 섬유아세포에서 분화되어 나온다고 하였다.

interleukin-1 $\beta$ 는 단구세포의 산물로 면역체계의 중요한 요소이고, 치주염 등 염증반응에 관여한다. 교정력이 가해지면 치아주위 조직은 급성 염증 양상을 보이고, 염증세포 분비물인 cytokine 특히 interleukin-1 $\beta$ 가 교정적 골 개조에 주로 관여를 하는 것으로 알려졌다<sup>5)</sup>.

저자는 본 연구에서 치주인대 섬유아세포에 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 가하여 세포 모양의 변화를 광학 현미경으로 관찰하고, collagenase와 TIMP-1의 발현에 미치는 영향을 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)과 면역조직화학 염색을 사용하여 관찰하여, 이를 통해 기계적 자극에 의한 치주조직의 개조에 따른 생화학적 변화를 알아보고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 치주인대 섬유아세포 배양

치주인대 섬유아세포의 배양은 Oates 등<sup>12)</sup>의 방법에 준하여 시행하였다. 교정 치료를 받고자 내원한 4명의 10대의 남자 환자들에서 완전히 맹출되고 치근 표면에 병소가 없는 상하악 제 1 소구치를 발치하여 부착된 치은을 날카로운 큐렛으로 제거하였다. 치관부는 5.25% sodium hypochlorite 용액에 2분간 담가서 박테리아 및 잔존 상피세포를 제거한 후 치아를 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml fungizone (Gibco, Grand Island, USA), 20% fetal bovine serum (FBS : Gibco)이 첨가된  $\alpha$ -mi-



Fig. 1. The stress apparatus assembly. Cells were cultured on a flexible membrane of Petriperm® dish which was placed over a template with a convex surface. A lead weight placed on the top of the dish forced the membrane and the tightly attached cells to be stretched.

nimum essential media ( $\alpha$ -MEM : Gibco)에 넣어 배양하였다. 발치된 치아들을 배양액에 5회 세척후 치근 중앙 1/3를 부위의 치주인대를 날카로운 큐렛으로 채취하여 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml fungizone, 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM 배지가 든 배양접시에 고르게 분산시킨 후 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 흡입배양기에서 2, 3일 간격으로 배양액을 교환해주면서 충분히 자랄 때까지 배양하였다. 분주와 계대배양은 0.25% trypsin/ EDTA (Gibco)를 이용하였고, 실험에는 4-6 세대의 세포를 사용하였다.

2. 기계적 자극의 적용과 interleukin-1 $\beta$ 의 투여와 조직학적 관찰

배양세포가 80% 정도 충분히 자라면 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml fungizone, 0.1% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM 배지를 넣고 친수성의 유연한 플라스틱 성장 표면을 가진 Petriperm® dish (Heraeus, South Plainfield, USA)에 배양하였다. 아무런 처리를 안한 군을 대조군으로 삼았고, 실험군들은 기계적 자극을 준 군, interleukin-1 $\beta$  (R&D, Minneapolis, USA)을 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군으로 나누었다. Petri-

perm $\text{\textcircled{d}}$  dish의 아래에 블록한 시계 유리 (성산과학, 서울, 한국)를 대어 Ngan 들<sup>11)</sup>의 보고에 따라 표면적을 5% 증가시키고, 위에 납으로 만든 추 (대산과학, 서울, 한국) 100 g을 올려놓음으로써 기계적 자극을 가하였다 (Fig. 1). 섬유아세포의 변형량은 Petriperm $\text{\textcircled{d}}$  dish 바닥 표면적의 증가량으로 간접적으로 산출하였다. 시계유리로 인해 높아진 Petriperm $\text{\textcircled{d}}$  dish의 바닥의 높이를 h, Petriperm $\text{\textcircled{d}}$  dish의 반지름을 d라고 하였을 때 Petriperm $\text{\textcircled{d}}$  dish 바닥 표면적의 증가량은  $(h^2/d^2 + h - 1)$ 이다. interleukin-1 $\beta$ 를 준 군에서는 Ngan 들<sup>11)</sup>의 보고에 따라 interleukin-1 $\beta$ 를 1.0 ng/ml 투여하였다. 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군에서는 Petriperm $\text{\textcircled{d}}$  dish의 표면적을 5% 증가시키고 interleukin-1 $\beta$  1.0 ng/ml 투여후 납으로 만든 추 100 g을 올려놓았다. 대조군과 각 실험군들에서 각각 2시간, 4시간, 8시간 후 세포 모양의 변화를 광학 현미경으로 관찰하였다.

### 3. 역전사 중합효소 연쇄반응과 그 산물의 반정량

#### ① 총 mRNA 분리

각 군의  $4-5 \times 10^6$ 의 섬유아세포로부터 Ultraspec II kit (Biotex laboratory, Houston, USA)를 이용하여 총 mRNA를 분리하였다. 즉 세포에 1 ml의 Ultraspec II 시약을 혼합하여 균질화시킨 후 얼음속에 넣어 5분간 반응을 멈추게 한 다음 chloroform 200  $\mu$ l를 혼합하여 다시 5분간 얼음에서 반응을 정지시켰다. 12,000 rpm에서 4 $^{\circ}$ C 상태로 15분간 원심 분리하여 상층액을 추출하고 상층액에 isopropanol을 추출액의 0.5 volume, RNA tack resin (Biotex Laboratory)을 0.05 volume 혼합하여 30초간 혼합하고 1분간 15,000 rpm으로 원심 분리하여 미세원침관 바닥에 가라앉은 pellet만 남기고 상층액을 버렸다. 75% ethanol 1 ml로 2차례 세척한 후 50  $\mu$ l의 diethyl pyrocarbonate 처리된 탈이온수에 녹이고 원심 분리한 후 상층액을 추출하여 mRNA를 얻었다. 분리된 mRNA는 분광광도계 (Spectronic 21D : Milton Roy, Rochester, USA)로 정량하였고, cDNA 합성 때까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

#### ② cDNA 합성

분리된 mRNA 1  $\mu$ g에 random hexamer (hexanucleotide mix : Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) 2  $\mu$ l를 혼합하여 60 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키

고 얼음에서 3분간 반응을 멈추었다. 각 시료마다 20 단위의 RNasin (RNase inhibitor, Boehringer-Mannheim)과 각각 1 mM씩의 dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 400 mM의 DTT (1,4-dithiothreitol) 0.5  $\mu$ l, 4  $\mu$ l의 5 $\times$ 역전사 효소 완충액 (Boehringer-Mannheim)을 혼합하고 역전사효소 (20단위/ $\mu$ l : Boehringer-Mannheim) 0.8  $\mu$ l를 혼합하여 총 반응액을 20  $\mu$ l로 만든 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간, 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 증류수를 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### ③ 염기서열 핵산 시발체의 합성

Alvares 들<sup>11)</sup>의 보고에 의해 (주)바이오니아 (청원, 한국)에 collagenase와 TIMP-1의 시발체의 합성을 의뢰하였고, aldolase를 내부 대조 유전자로 하였다. 각 시발체의 염기서열은 다음과 같다.

aldolase

sense 5'-TCATCCTCTTCCATGAGACTCTA-3'

anti-sense 5'-ATTCTGCTGGCAGATACTGGCATAA-3'

collagenase

sense 5'-CGACTCTAGAAACACAAGAGCAAGA-3'

anti-sense 5'-AAGGTTAGCTTACTGTACACGCTT-3'

TIMP-1

sense 5'-ATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATAG-3'

anti-sense 5'-TGCTGGGTGGTAACTCTTTATTTC-3'

#### ④ 중합효소 연쇄반응

합성된 cDNA 5  $\mu$ l에 5' 시발체와 3' 시발체를 20 pmol씩 혼합하고, 5  $\mu$ l의 PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3, Boehringer-Mannheim)와 각각의 0.2 mM씩의 dATP, dTTP, dGTP, dCTP를 혼합하였다. 여기에 2.5단위의 Taq DNA polymerase (Boehringer-Mannheim)를 혼합하여 총 반응액을 50  $\mu$ l로 만든 후 Gene Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA)에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 60초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 중합효소 연쇄반응의 산물의 증가가 없어지기 직전의 주기를 결정하고 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. aldolase, collagenase, TIMP-1의 시발체는 각각 314, 786, 691 base pair에 중합효소 연쇄반응의 산물을 생성하였다.

#### ⑤ 전기영동과 반정량

aldolase, collagenase, TIMP-1을 각각 25주기로 반응시켜 대수적 증폭기동안의 중합효소 연쇄반응 산물을 모으고 2% agarose gel에서 전기영동하였다.

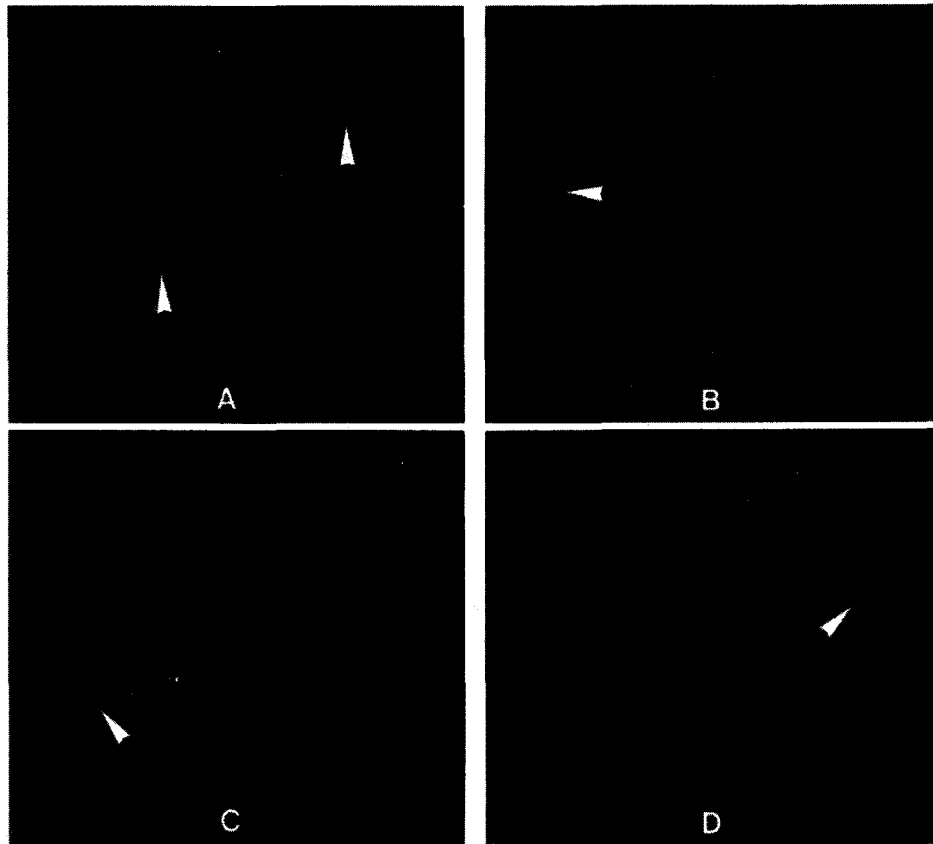


Fig 2. Photomicrograph of human periodontal ligament fibroblasts cultured in Petriperm® dish after 8 hours in the control group (A), the mechanical stress treated group (B), the interleukin-1β treated group (C) and the mechanical stress and interleukin-1β treated group (D). The arrow heads in A indicate stellate shape fibroblasts. The arrow heads in B, C and D indicate more elongated fibroblasts. (×100).

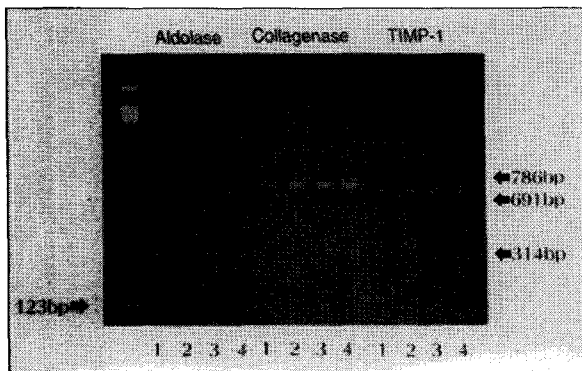
gel은 ethidium bromide로 염색하고, 밀도측정기와 영상분석기 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 반정량하였다. mRNA수준에서 증감량을 알기 위해 다음의 식으로 비교하였다.

$$\frac{(\text{실험군의 collagenase 혹은 TIMP-1}) / (\text{실험군의 aldolase})}{(\text{대조군의 collagenase 혹은 TIMP-1}) / (\text{대조군의 aldolase})}$$

#### 4. 면역조직화학 염색

대조군과 각 실험군의 collagenase와 TIMP-1의 발현을 단백질 수준에서 알아보기 위해 면역조직화학 염색을 시행하였다. collagenase와 TIMP-1은 생성후 세포내 저장에 되지 않고 바로 분비되기 때문에 세포

로부터 분리되는 것을 억제하기 위해 마지막 3시간전 monensin 5 μM (Sigma, St. Louis, USA)을 대조군과 실험군의 배지에 넣어주었다. 대조군과 각 실험군 모두 24시간동안의 배양후 4% paraformaldehyde (Sigma)에 10분간 고정하였고, phosphate buffer saline (PBS)로 세척하였고, 다시 0.1% Triton X-100 (Sigma)에 10분간 처리하였다. 그 후 methanol에 든 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 에서 내인성 과산화효소의 활성을 제거하였다. PBS로 5분간 3회 세척하고, 세포를 1.5% 정상 토끼 혈청에 20분간 반응시켜 비특이적 결합을 방지하고 1:100으로 희석된 일차 항체 mouse anti-MMP-1 단일클론항체와 mouse anti-TIMP-1 단일클론항체 (Biogenesis, Sandown, USA)를 4℃에 24시간 반응시켰다. 세포를 PBS로 세척하고, 30분간 biotinylated anti-mouse IgG와 biotin avidin peroxidase



**Fig 3.** 1  $\mu$ g of total mRNA from control and experimental groups after 8 hours incubation was processed to amplify aldolase, collagenase, TIMP-1 cDNA by RT-PCR. PCR products were separated with 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Representative gel of amplification products after 25 cycles for aldolase, collagenase, TIMP-1. The band for aldolase (314 bp), collagenase (786 bp), TIMP-1 (691 bp) were demonstrated. The left lane is the DNA molecular weight markers of 123-bp ladder DNA. (1= the control group : 2= the mechanical stress treated group : 3= the interleukin-1 $\beta$  treated group : 4= the mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  treated group)

complex (DAKO, Carpinteria, USA)를 30분간 처리하였다. 다시 PBS로 씻고 peroxidase substrate 용액을 처리하여 발색시키고, 물에 세척하여 Mayer hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

### 5. 통계처리

전기영동 후 염색된 gel을 밀도측정기와 영상분석기로 측정하여 대조군에 대한 각 실험군들의 collagenase와 TIMP-1의 상대적인 증감을 중앙값 (median)과 범위 (range)로 표시하였고, SAS for Windows software 통계 프로그램 (Ver. 6.04)을 이용하여 통계처리하였다. 각 시간대별 대조군에 대한 각 실험군간의 상대값을 비교하기 위해 Kruskal-Wallis 검정을 시행하였다. 또한 각 시간대별 각 군의 차이를 알아보기 위해 다중비교 방법으로 튜키의 표준화 범

위 검정을 시행하였고, 통계적인 유의성은 P값이 0.05 미만일 때로 하였다.

## III. 결 과

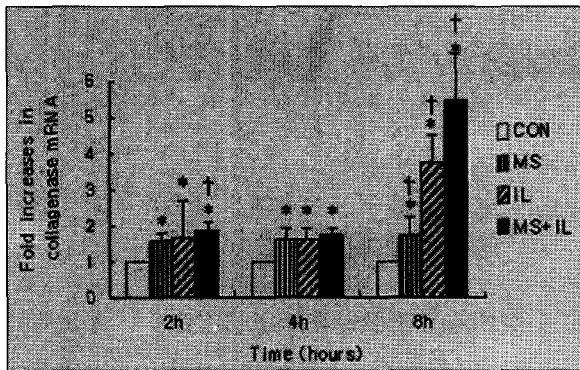
### 1. 대조군과 실험군의 치주인대 섬유아세포의 광학현미경상의 소견

광학현미경으로 관찰한 대조군의 치주인대 섬유아세포는 전형적인 별모양과 길쭉한 형태를 보였고 (Fig. 2의 A), 기계적 자극, interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서는 별모양의 세포는 사라지고 길쭉한 세포가 더욱 더 길어진 양상을 보였다 (Fig. 2의 B, C, D). 한편 관찰된 각 실험군의 섬유아세포에서는 공포화 현상 등 세포의 퇴행성 변화는 관찰되지 않았다.

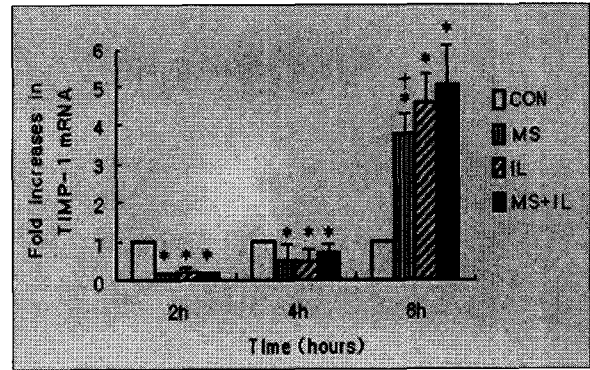
### 2. 역전사 중합효소 연쇄반응과 산물의 반정량

aldolase, collagenase, TIMP-1의 역전사 중합효소 연쇄반응 산물의 증감율이 거의 없어지기 바로 직전인 25회 순환 반응의 주기를 정하고 4명의 환자들의 시료를 모두 각 실험군별, 각 시간별로 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하여 반정량하였다 (Fig. 3). 각각의 시간대별로 대조군과 각 실험군들사이의 aldolase의 mRNA 발현의 정도는 차이가 없었다. 이런 점에서 aldolase는 이번 실험에서 유용한 내부 대조 유전자로 사용할 수 있었다.

각 실험군별, 각 시간별로 4번씩의 역전사 중합효소 연쇄반응의 결과 대조군에 대한 각 실험군들의 상대적인 증감을 중앙값 (범위)의 형태로 기술하면, 대조군에 대하여 기계적 자극을 준 군, interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군의 collagenase의 상대적인 발현 비율은 실험 2시간후 각각 1.61 (0.22), 1.68 (1.19), 1.89 (0.22) 배, 실험 4시간후 각각 1.62(0.37), 1.60 (0.36), 1.72 (0.25) 배, 실험 8시간후에서는 1.73 (0.45), 3.78 (0.63), 5.48 (1.34) 배로 증가하였다 (P<0.05). 기계적 자극을 준 군, interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군들사이의 collagenase 발현 차이를 살펴보면 실험 2시간에서는 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군에서 나머지 2군들보다 많은 collagenase의 발현을 보였고 실험 8시간후에서는 3군들이 모두 차이를 보였다 (P< 0.05) (Fig. 4).



**Fig 4.** RT-PCR products were analyzed from periodontal ligament fibroblast cells of 4 different donors in the control and the experimental groups after 2, 4, 8 hours. Aliquots were drawn at PCR cycle 25, semi-quantitation was done and the fold increase in collagenase mRNA was determined as described in Methods. Data were shown as median, range for 4 cultures. (n=4, CON=the control group : MS=the mechanical stress treated group : IL=the interleukin-1 $\beta$  treated group : MS+IL= the mechanical stress and Interleukin-1 $\beta$  treated group)  
 \* : significantly different from CON (P<0.05)  
 † : significantly different among MS, IL, MS+IL (P<0.05)



**Fig 5.** RT-PCR products were analyzed from periodontal ligament fibroblast cells of 4 different donors in the control and the experimental groups after 2, 4, 8 hours. Aliquots were drawn at PCR cycle 25, semi-quantitation was done and the fold increase in TIMP-1 mRNA was determined as described in Methods. Data were shown as median, range for 4 cultures. (n=4, CON=the control group : MS=the mechanical stress treated group : IL=the interleukin-1 $\beta$  treated group : MS+IL= the mechanical stress and Interleukin-1 $\beta$  treated group)  
 \* : significantly different from CON (P<0.05)  
 † : significantly different among MS, IL, MS+IL (P<0.05)

대조군에 대한 기계적 자극을 준 군, interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군의 TIMP-1의 상대적인 발현 비율은 실험 2시간후 각각 0.16 (0.03), 0.15 (0.26), 0.15 (0.07) 배, 실험 4시간후 각각 0.49 (0.51), 0.44 (0.32), 0.70 (0.31) 배로 감소하였으나 (P<0.05), 실험 8시간후에서는 3.77 (0.70), 4.46 (0.85), 4.81 (1.15) 배로 증가하였다 (P<0.05). 기계적 자극을 준 군, interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군들사이의 TIMP-1 발현 차이를 살펴보면 실험 2시간에서는 기계적 자극을 준 군보다 나머지 2군들에서 많은 TIMP-1의 발현을 보였다 (P<0.05) (Fig. 5).

**3. 면역조직화학 염색**

각군들에서 면역조직화학 염색을 시행하여 collagenase와 TIMP-1의 발현을 광학현미경으로 관찰하였다. collagenase는 대조군에서는 거의 염색이 되지

않았으나 기계적 자극을 준 군, interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군에서는 세포질에 과립형의 적색으로 염색되었다 (Fig. 6). TIMP-1은 핵과 세포질에서 광범위하게 적색으로 염색되었다 (Fig. 7).

**IV. 고 안**

정상적인 성장, 발육과 많은 질환에 나타나는 결합 조직의 개조와 분해는 세포의 기질의 분해와 연관이 있다. 이러한 세포의 기질의 분해를 담당하는 것이 matrix metalloproteinase군이고, 이것은 collagenase, gelatinase, stromelysin, matrilysin, metalloelastase, membrane형의 matrix metalloproteinase등으로 나뉘어진다<sup>13)</sup>. 이중 collagenase는 섬유아세포형 (MMP-1)과 호중구형 (MMP-8)으로 나뉘어지고, MMP-1은 교정력에 의한 치주조직의 개조에 관여하고, MMP-8은 성인형 치주염 등 염증반응에 연관이 있다<sup>10)</sup>.

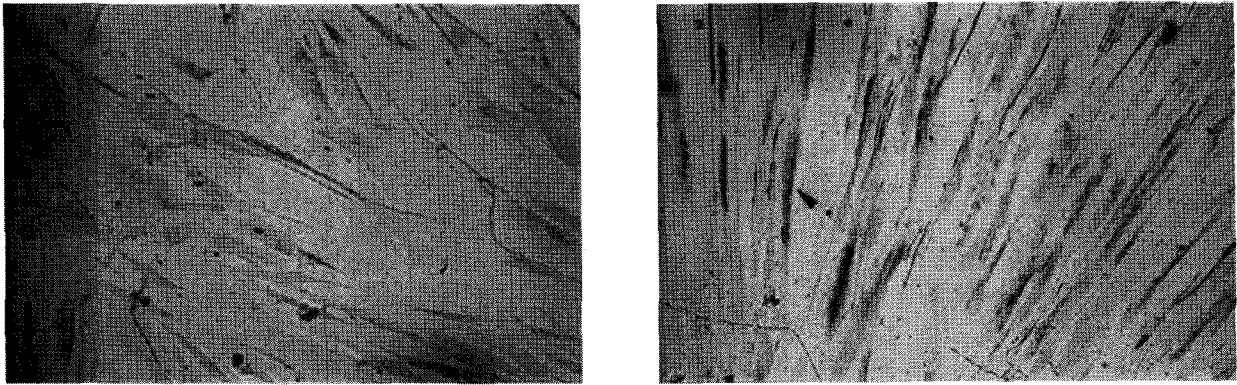


Fig 6. Photomicrograph of human periodontal ligament fibroblasts stained immunohistochemically for collagenase after 24 hour incubation. The arrow head in 2 indicates immunohistochemically stained cytoplasm ( $\times 100$ ). (1=the control group, 2= the mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  treated group)

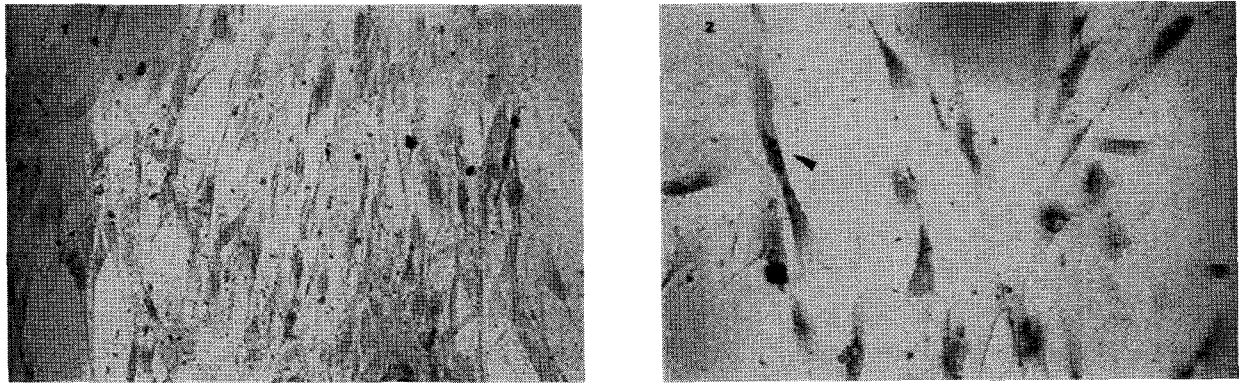


Fig 7. Photomicrograph of human periodontal ligament fibroblasts stained immunohistochemically for TIMP-1 after 24 hour incubation. The arrow head in 2 indicates immunohistochemically stained cytoplasm and nuclei ( $\times 100$ ). (1=the control group, 2= the mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  treated group)

건강한 치주조직을 가진 교정환자의 치은 열구액에서 다량의 MMP-1이 발견되고, 이중 80%가 활성화된 형태였으며, 이들은 주로 치은조직, 치주인대, 치조골에서 기원한다<sup>16)</sup>. 본 연구에서 사람의 치주인대 섬유아세포에 기계적 자극을 가했을 때 collagenase 발현이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 4). 기계적 자극이 결합조직 세포를 어떻게 활성화시키는지는 잘 알려지지 않다. Meikle 들<sup>9)</sup>은 결합조직의 세포에 기계적 자극이 가해질 때의 세포의 반응에 대한 가설을 다음과 같이 제안하였다. 첫단계로 외부의 자극이 의미있는 생화학적 전달체계로 바뀌어진다는 것이다. 즉, 기계적 자극이 가해지면 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid가 분비되어 prostaglandin 생성이 증가하고,

cAMP와 calcium의 유입이 증가한다고 하였다. 두번째 단계로 활성화된 세포에서 교원질과 collagenase의 분비가 촉진되고, TIMP-1은 감소된다고 하였다. 세번째 단계로 cytokine을 분비하여 골의 대사에 관여한다는 것이다. Heath 들<sup>6)</sup>은 백서의 조골세포에 기계적 자극을 가했을 때 세포막의 phospholipid를 자극하여 prostaglandin 생성이 증가하여 collagenase의 생성을 증가시키고, 외인성의 prostaglandin만을 투여하였을 때에도 collagenase의 생성이 같은 정도로 증가하였음을 관찰하여 기계적 자극에 의한 collagenase의 생성에 prostaglandin이 관여를 할 것이라고 보고하였다. 이러한 prostaglandin의 증가가 본 실험에서 나타난 collagenase의 발현 증가와 어떤 연관성이 있는지는

더욱 연구해 보아야 하겠다.

또한 본 실험에서 interleukin-1 $\beta$ 를 가한 경우 collagenase가 증가하였고, 특히 8시간 후에는 급속히 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 4). 이는 치주인대 섬유아세포가 interleukin-1 $\beta$ 에 대한 특이적인 수용체를 가지고 있기 때문이라 생각된다. 교정력이 가해질 때의 치주조직의 초기 반응은 급성 염증을 수반하고, 치주인대 혈관의 확장과 모세혈관에서의 염증세포가 증가하는 것으로 알려지고 있다<sup>5)</sup>. 염증세포에서 분비되는 cytokine은 섬유아세포와 조골세포에 직접 혹은 간접적으로 영향을 미쳐 치주조직의 대사에 영향을 줄 수 있다. Saito 들<sup>15)</sup>은 고양이의 견치에 교정력을 가해 interleukin-1 $\beta$ 의 발현을 면역조직화학 염색으로 확인하여 interleukin-1 $\beta$ 가 교정적 치아 이동에 관여한다고 보고하였고, 기계적 자극에서와 같이 세포질 골격의 변화를 초래해 interleukin-1 $\beta$ 가 collagenase를 생성할 수 있다고 보고되고 있다<sup>19)</sup>. 본 실험에서도 interleukin-1 $\beta$ 를 투여한 군의 세포의 모양이 기계적 자극을 준 군의 모양과 유사하였고 (Fig. 2), 이는 이들 모두가 세포질 골격의 변화를 초래하기 때문이라고 사료된다.

기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 준 군의 collagenase의 상대적인 발현은 이들을 단독으로 준 군들에 비해 실험 8시간후 더욱 크게 나타남을 관찰하였는데 (Fig. 4), 이는 기계적 자극이 interleukin-1 $\beta$ 가 섬유아세포에 존재하는 특이적인 수용체에 결합하는 능력을 증가시켜 collagenase의 발현을 증가시키기 때문이라고 사료된다.

본 실험에서 외부의 자극을 가하면 치주인대 섬유아세포에서 collagenase의 생성이 증가하고 시간이 지남에 따라 collagenase의 억제물질인 TIMP-1의 생성도 증가함을 관찰하였다 (Fig. 4, 5). 기계적 자극, interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 투여한 군들에서 실험 2, 4시간에서는 collagenase가 증가하였고 TIMP-1은 감소하였으나, 실험 8시간후 interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 같이 투여한 군에서 collagenase가 급속히 증가하고 TIMP-1도 증가하였다. 이러한 collagenase와 TIMP-1의 변화는 외부 자극에 대한 치주조직의 항상성을 유지하려는 기전으로, 이런 조화가 깨어지면 치주조직의 파괴가 일어난다<sup>7,8)</sup>. 본 실험의 결과는 섬유아세포가 생리적 자극에 의해 collagenase와 TIMP-1의 합성 조절을 통해 항상성을 유지함을 보여준다.

한편, 치주인대 섬유아세포는 조골세포의 기원이

된다<sup>2)</sup>. 골 흡수를 담당하는 세포는 파골세포이지만 부갑상선 호르몬 등 골 흡수를 유발하는 물질에 대한 수용체는 파골세포가 아닌 조골세포에 존재한다<sup>18)</sup>. 조골세포는 collagenase를 분비하고 활성화된 collagenase는 골 조직 표면의 유골층 (osteoid layer)을 제거하여 파골세포로 하여금 골 흡수를 시작하게 한다<sup>4)</sup>. 본 실험에서 나타난 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 에 의한 섬유아세포의 collagenase의 생성 증가는 골 조직의 개조에도 영향을 미칠 것으로 생각된다. 단일 종류의 세포를 배양한 본 실험에서는 각 세포의 반응을 단독으로 알 수 있는 장점이 있지만, 치주 조직내의 다른 세포들과의 상호작용이 배제되어 있고, 관찰한 생성 산물이 치주인대 섬유아세포의 산물의 전부가 아니기 때문에 이 실험의 결과만으로는 교정력에 의한 치주조직의 개조 현상을 모두 설명할 수는 없을 것이다. 그러므로 이러한 점을 보완하는 연구가 계속 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 실험에서는 사람의 치주인대 섬유아세포에 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 가하여 이를 조직학적으로 관찰을 하였고 collagenase와 TIMP-1의 생성을 RT-PCR과 면역조직화학 염색에 의하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 광학 현미경으로 세포의 형태를 관찰한 결과 대조군에서는 전형적인 별모양과 길쭉한 모양을 함께 보였으나 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서는 별모양의 세포가 사라지고 모양이 더욱 길어졌다.
2. collagenase는 대조군에 비해 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서 증가하였고, 실험 8 시간 후에는 interleukin-1 $\beta$ 를 준 군, 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 동시에 준 군에서 뚜렷한 증가를 보였다.
3. TIMP-1은 세포 자극 2, 4시간 후에는 대조군에 비해 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서 감소하였지만, 실험 8 시간 후에는 증가를 보였다.
4. 면역조직화학 염색을 통해 collagenase와 TIMP-1이 대조군에 비해 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 를 각각 혹은 동시에 준 군들에서 더욱 강한 염색상을 나타내었다.



본 실험의 결과 섬유아세포는 외부 자극이 가해지면 collagenase와 TIMP-1의 발현 조절을 통해 치주인대 재생과 치조골의 개조에 영향을 미쳐 항상성을 유지하려고 함을 알 수 있었다.

본 논문을 작성하는데 많은 도움을 주신 연세대학교 치과대학 구강 병리학교실 육종인 교수님, 가톨릭대학교 소아과 정대철 교수님과 성 바오로병원 임상 의학 연구소 김정수 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. Alvares O, Klebe R, Grant G, Cochran DL. Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *J. Periodontol.* 1995; 66: 552-558
2. Audin JE, Heersche JNM, Merrilees MJ, Sodek J. Isolation of bone cell clones with differences in growth, hormone-responses, extracellular matrix production. *J Cell Biol.* 1982; 92: 452-461
3. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodont Res.* 1993; 64: 474-484.
4. Chamber TJ, Darby JA, Fuller K. Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res.* 1985; 241: 671-683
5. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent. Clin. North. Am.* 1988; 32: 411-435
6. Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynold JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agent. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 802: 151-154
7. Kryshlitsky E, Sodek J, Ferrier JM. Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis in the dog. *Arch Oral Biol.* 1986; 31: 21-31.
8. Larivee J, Sodek J, Ferrier JM. Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res.* 1986; 21: 702-715.

9. Meikle MC, Heath JK, Atkinson SJ, Herby RM, Reynolds J.J. The biology of tooth movement. In: Norton LA, Burstone CJ, editors. *The biology of tooth movement.* Florida : CRC Press. 1989; 71-85
10. Myajima K, Kasai R, Kahn AJ, Hayakawa T, Iizuka T. Biological mechanisms of tooth movement; in vitro analysis and clinical application. In: Davidovitch Z, editor. *Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.* Alabama : EBSCO, 1992:311-318
11. Ngan PW, Saito S, Saito M, Lanese R, Shanfeld JL, Davidovitch Z. The interactive effects of mechanical stress and interleukin 1- $\beta$  on prostaglandin E and cAMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro: comparison with cloned osteoblastic cells of mouse. *Archs. Oral Biol.* 1990; 35: 717-725
12. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol.* 1993; 64: 142-148.
13. Reynold JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodon.* 2000. 1997; 14: 144-157
14. Roberts WE, Chase D. Kinetics of cell proliferation and migration associated with orthodontically induced osteogenesis. *J. Dent. Res.* 1981; 60: 174-181
15. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin 1-beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1991; 99: 226-240
16. Sorsa T, Ingman T, Mikkonen T, Suomalainen K, Goulb LM, Thesleff I. Characterization of interstitial collagenase in gingival crevicular fluid during tooth movement in man. In: Davidovitch Z, editor. *Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation.* Alabama : EBSCO, 1992: 47-52
17. Ten Cate AR. *Oral Histology : Development, Structure and Function.* 4th ed. St. Louis : Mosby. 1994
18. Vaes G, Delaisse JM, Eeckhout Y. Relative roles of collagenase and lysosomal cysteine-proteinase in bone resorption. In: Birkedal-Hansen H, Werb Z, Welgus HG, Van Wart HE, editors. *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors.* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992: 383-388
19. Werb Z, Hermby RM, Murphy G, Aggeler J. Commitment to expression of metalloproteinase, collagenase and stromelysin : relationship of inducing agents to changes in cytoskeletal architecture. *J Cell Biol.* 1986; 102: 697-702

- ABSTRACT -

## Effects of mechanical stress and interleukin-1 $\beta$ on collagenase and TIMP-1 expression in human periodontal ligament fibroblasts

Myung-Lip Kim, D.D.S., M.S.D. Ph.D, Chang Bae, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Division of Orthodontics, Department of Dentistry, Catholic University*

The turnover of collagen is controlled by the balance between collagen synthesis and degradation. The production of collagenase (matrix metalloproteinase-1) and its inhibitor, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) are one of the substances which regulate this balance. The periodontal ligament fibroblast plays an important role in collagen metabolism during orthodontic treatment and is believed to be an origin of the osteoblast in the alveolar bone. The collagenase secreted by the periodontal ligament fibroblast and the osteoblast initiates the bone resorption by removing the osteoid layer in the alveolar bone. The interleukin-1 $\beta$  is secreted by the macrophage during orthodontic treatment. The present study was undertaken to assess the effect of mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  on the expression of collagenase and TIMP-1 in the periodontal ligament fibroblasts using reverse transcription polymerase chain reaction and immunohistochemical staining. The periodontal ligament fibroblasts were stretched by placing the Petriperm® dish on the top of spheroidal convex watch glass (5% surface increase) and treated with interleukin-1 $\beta$  (1.0 ng/ml), or treated with both of them. Treatment with mechanical stress and/or interleukin-1 $\beta$  resulted in increased collagenase mRNA expression. The mechanical stress treated group (1.61, 1.62, 1.37 fold increase), the interleukin-1 $\beta$  treated group (1.68, 1.60, 3.78 fold increase), the mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  treated group (1.89, 1.72, 5.48 fold increase) induced increases in collagenase mRNA compared with the control group after 2, 4, 8 hours respectively. But, TIMP-1 mRNA expressions at experimental groups were decreased after 2, 4 hours and increased after 8 hours. The mechanical stress treated group (0.16, 0.49 fold decrease and 3.77 fold increase), the interleukin-1 $\beta$  treated group (0.15, 0.44 fold decrease and 4.46 fold increase), the mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  treated group (0.15, 0.69 fold decrease and 4.81 fold increase) induced changes in TIMP-1 mRNA compared with the control group after 2, 4, 8 hours, respectively. Immunohistochemical stain showed that increased collagenase and TIMP-1 staining of the mechanical stress treated group, the interleukin-1 $\beta$  treated group, and the mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  treated group compared with that of the control group after 8 hours. These findings suggest that mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  regulate expression of collagenase and TIMP-1.

KOREA. J. ORTHOD. 1998 ; 28 : 165-174

\* **Key words** : mechanical stress, interleukin-1 $\beta$ , collagenase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1