

백서의 치아이동 시 피질골 천공이 치주조직의 MMP-1, -8, -13 mRNA의 발현에 미치는 영향

곽 춘^a · 김성식^{b,e} · 박수병^c · 손우성^c · 김용덕^d · 전은숙^e · 박미화^e

본 연구는 피질골 천공을 동반한 교정적인 치아이동이 통상의 교정적인 치아이동과 조직 재형성의 정도에 차이가 존재하는지 알아보기 위하여 시행하였다. 실험동물은 15주령 군 300 - 350 g의 자성 백서(Sprague-Dawley Rat)를 사용하였으며 피질골 천공을 동반한 치아이동 실험군(TMC group, n = 16)과 단순 치아이동 대조군(TM group, n = 16)으로 나누었다. 모든 실험동물에 20 gm 이하의 힘으로 전치부를 이개시키는 치아 이동을 시행하였으며, 실험군은 상악전치부의 직후방 구개측에서 치근을 손상시키지 않도록 직경 1.0 mm의 microscrew를 사용하여 피질골 천공을 하였다. 모든 실험동물은 1, 4, 7, 14일에 희생시켜서 matrix metalloproteinase (MMP)-1, -8, -13 효소의 RT-PCR과 I형 교원질(Collagen type I)과 Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)의 면역조직화학염색(immunohistochemistry)을 시행하였다. MMP-1은 실험군에서 4일째에 가장 활발한 발현을 보이다가 7일째와 14일째에 조금씩 감소하는 경향을 보인 반면에, 대조군에서는 실험 7일째에 가장 높은 발현을 보이다가 14일째 들어서 감소하는 양상을 보였다. MMP-8은 실험 1일째부터 실험군이 대조군에 비해서 더 많은 발현을 보였으며, 특히 4일째의 실험군에서는 대조군보다 두 배 이상 발현되었다. MMP-13은 실험 1일째의 실험군에서 가장 높은 발현도를 보였으며, 대조군에서는 오히려 미처치 대조군에 비해 더 낮게 발현되었다. I형 교원질의 면역조직화학염색 결과는 실험 4일째부터 압박측에서는 실험군에서 대조군보다 더 많은 교원질의 소실을 보였고, 인장측에서는 대조군이 실험군보다 더 많은 교원질의 염색 소견을 보였다. TIMP-1은 실험 4일째에는 압박측에서 대조군이 실험군보다 치주인대와 치조골의 골세포에서 좀 더 균일한 염색 소견을 보였다. 이상의 실험 결과에서 피질골 천공은 백서의 실험적 치아이동에 있어 치주인대와 치조골 결합 조직의 재형성 속도를 증가시키는 것으로 판단된다. (대치교정지 2008;38(3):187-201)

주요 단어: 기질단백분해효소, I형 교원질, 피질골 천공

서론

치아에 가해지는 교정력은 치아 주위 조직에 생역학적인 자극을 발생시키며, 이런 과정에서 나타나는 치주인대와 치조골의 재형성을 통해서 치아이동이 이루어진다. 따라서 효율적인 교정치료를 위해서 치주인대와 치조골의 재형성에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구가 있어 왔다. Yamasaki 등¹은

prostaglandin E₂ (PGE₂)를, Takano-Yamamoto 등²은 Vitamin D (1,25-(OH)₂D₃)를, 그리고 Soma 등³은 parathyroid hormone (PTH) 같은 약물을 국소적으로 치주인대강에 주입하여 빠른 치아이동을 얻고자 하는 노력들을 하였다. 그러나 prostaglandin E₂는 국소적인 통증을 증가시키면서 치근 흡수도 동시에 유발할 수 있으며, vitamin D나 parathyroid hormone은 전신적인 대사에 영향을 줄 수 있는 것으로 밝혀져서 임상적인 적용은 어려웠다.

한편 임상 교정 영역에서 악교정수술을 시행한 환자에서 술 후 교정치료 시 치아이동의 속도가 증가하는 현상을 종종 목격할 수 있다. 이런 현상은 Frost^{4,6}가 주장한 국소적 치유촉진현상(regional acceleratory phenomenon, RAP)으로 설명되어 왔다. RAP는 외상을 받은 조직이 치유되는 과정에서 정상보다 많은 골대사 산물들이 집중되어서 치유가

^a대학원생, ^b부교수, ^c교수, 부산대학교 치의학전문대학원 치과교정학교실.

^d부교수, 부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실.

^e연구원, 부산대학교병원 의학연구소.

교신저자: 김성식.

부산시 서구 아미동 1가 10 부산대학교병원 치과교정과.

051-240-7443; e-mail, softid@pusan.ac.kr.

원고접수일: 2007년 2월 12일 / 원고최종수정일: 2008년 3월 26일 /

원고채택일: 2008년 3월 28일.

보다 촉진되는 경향을 말하는 것이다. Kole⁷, Wilcko 등⁸은 피질골 절단술을 한 경우에 치아이동의 속도가 증가하지만, 별다른 부작용은 없었다는 임상증례를 발표하였으며, 이런 현상이 RAP 때문에 일어난다고 주장하였다. 그러나 RAP 현상의 기전에 대한 연구는 아직 미비한 실정이어서 효율적인 치아이동을 위해서 보조적인 외과 술식을 임상 교정 영역에 적용하는 것에 대한 많은 연구가 있어야 할 것이다. 또 이를 위해서는 치아이동 시에 일어나는 치조골과 치주인대 조직의 생물학적인 반응을 이해하는 것이 필수적이다.

치아이동 과정 중에 나타나는 주위 조직의 반응은 무기질의 용해가 주로 일어나는 치조골의 흡수와 교원질이 주요 성분인 유기기질 분해의 2단계 과정을 통해서 이루어진다. 최근에 무기질의 용해를 위해서 조골세포, 파골세포를 활성화 및 억제와 관련된 사이토카인(cytokine)들인 osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor kB (RANK), receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) 등이 밝혀지면서 이에 대한 활발한 연구들이 진행되어 왔다.⁹ 그리고 유기기질 분해에 관여하는 효소에 대한 연구는 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)를 중심으로 이루어지고 있다. MMP는 발육 과정, 염증성 질환, 퇴행성 관절 질환, 종양 개시, 그리고 상처의 치유 과정 동안에 나타나는 다양한 세포들에서 발견된다.^{10,11} 대부분의 MMP는 효소전구체의 형태로 생성되어서, 성숙한 형태로 바뀌는 과정에서 특정 부위가 분리되면서 분비되는데, 활성화는 zinc ion 과 calcium ion이 있을 때 이루어진다. 치주인대에 많이 분포하는 교원질의 분해에는 주로 MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들을 collagenase group으로 분류한다. 이 외에도 MMP는 gelatinases (MMP-2, -9), stromelysins, 그리고 membrane-type MMP 등의 군으로 분류된다. Tsubota 등¹²은 치아가 맹출하는 동안에 치주인대의 섬유아세포에서 MMP-8이 발현되는 것을 보고하기도 하였다. 그러나 외과 술식을 동반하는 등의 다양한 형태의 치아이동 시에 치주조직에서 일어나는 유기기질분해에 대한 MMP의 작용과 나타나는 결과에 대한 연구는 그다지 많지 않은 실정이다.

본 연구는 피질골 천공을 동반한 교정적인 치아이동이 통상의 교정적인 치아이동 시에 일어나는 치주인대조직의 재형성 반응과 서로 어떤 차이점이 존재하는지 알아보기 위하여, RT-PCR (reverse tran-

scriptase-polymerase chain reaction)을 통해 치주인대 조직의 MMP-1, -8, -13 유전자 발현의 차이를 알아 보았다. 또, 치주조직의 재형성 과정 중에 나타나는 조직의 변화를 알아보기 위하여 MMP-1, -8, -13에 의해서 분해되는 collagen type I과 MMP의 작용을 억제하는 TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1)의 면역조직화학검사(immunohistochemistry)를 시행하였다.

연구방법

실험동물

실험동물은 일정 기간 동일 조건하에서 사육한 15주령 군 300 - 350 g 내외의 자성 백서(sprague-dawley rat) 32마리를 사용하였으며 피질골 천공을 시행한 치아이동군(실험군, TMC group; Tooth Movement with Cortical punching) 16마리와 단순 치아이동군(대조군, TM group; Tooth Movement only group) 16마리로 나누었다.

백서의 치아이동은 양쪽 상악 중절치 사이에 치간 이개용 탄성고무줄(Unistick colored ligatures, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA)로 실험 기간 동안 1 mm 이내로 이개되도록 착용시켜 시행하였다. 이를 통해 모든 실험동물에서 20 gm 이하의 힘으로 치아이동을 시행하였다.¹³ 실험군(TMC group)과 대조군(TM group)에서 각각 4마리씩 1, 4, 7, 14일에 희생시켰으며, 이 중 각 군당 1마리씩은 면역조직화학염색을 시행하였으며, 각 군당 나머지 3마리씩은 RT-PCR을 시행하였다.

피질골 천공

치간 이개 후 1, 4, 7, 그리고 14일이 경과한 백서의 대퇴부에 xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, Seoul, Korea) 10 mg/kg, ketamine chloride (Ketalar, Yuhan, Seoul, Korea) 100 mg/kg을 혼합하여 대퇴부에 근육 주사하여 전신 마취하였다. 실험군의 상악 전치부의 직후방 구개 측에 구개점막에 약 1 - 2 mm 내외의 절개선을 가한 후 직경 1.2 mm의 self tapping microscrew (Osteomed, Dallas, TX, USA)를 사용하여 피질골을 천공하였다. 피질골을 천공한 후의 microscrew는 다시 제거하였으며, 구개점막은 별다른 봉합을 실시하지 않았다.

표본 제작

상기의 방법으로 전신마취하여 심장관류법으로 조직을 고정하기 위하여 흉곽부에 Y절개를 가하여 흉곽을 열어 심장을 노출시킨 후 좌심실로 연동성 관류 펌프와 연결된 20계이지 바늘을 삽입하여 지혈겸자로 고정하고 펌프를 작동한 후 우심방의 벽을 절개하여 체순환된 혈액을 배출시키고 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하여 20분간 체내 혈액을 세척해냈다. 그 후 pH 7.2인 4% paraformaldehyde 고정액을 30분간 관류 펌프로 주입하였다. 관류고정 직후 이개부 치아를 포함한 상악골 분절골 절단술을 시행하고, 치근 중간 1/3부위를 횡단면 방향으로 경조직 절단기(Minitom, Struers, Ballerup, Denmark)를 사용하여 절단하였다. 그 다음 동일한 고정액에 6시간 동안 고정시키고 증류수 1,750 ml에 250 g의 EDTA와 25 g의 NaOH를 녹인 탈회액에 7주간 탈회시켰다. 그 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간 동안 수세한 다음, 통상적인 방법에 따라 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 한 후 paraffin에 포매하고 4 μ m 두께의 시상연속절편을 만들었다.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis (Table 1)

본 실험에서는 백서의 전치부 치아의 백악법랑경계(cemento-enamel junction, CEJ) 2 mm 하방의 치아, 치주인대, 치조골 부위의 조직을 RT-PCR을 위해서 사용하였다. 액화질소를 넣어 잘게 부순 sample에 TRI Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣어 섞어준 뒤, 4°C에서 5분간 두었다. 200 μ l의 chloroform

을 넣어서 다시 한 번 섞어준 후, 4°C에서 5분간 두었다. 그 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 상층을 새 튜브로 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 5분간 둔 후 다시 한 번 원심분리 하였다. 원심분리 하여 나온 pellets을 DEPC-70% ethanol로 씻은 후 건조시켜 DEPC-D/W에 녹였다. RNA는 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하여 reverse transcription reaction을 실시하였고 그 반응액은 1 \times RT buffer (Promega, Madison, WI, USA), 20 μ M dNTP, 0.25 μ g oligo (dT) 15 primer (Table 1), 5 unit AMV (avian myoblastosis virus) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) 및 2 μ g RNA와 DEPC-D/W를 가하여 총량을 20 μ l로 한 뒤 42°C에서 60분간 반응시켰다.

PCR 반응은 AccuPower Hotstart PCR PreMix kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하였다. 10 μ M sense primer 1 μ l, antisense primer 1 μ l, cDNA 1 μ l와 증류수를 넣어 최종 부피를 20 μ l로 하여 반응을 실시하였으며, 94°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 1분간 35회 실시한 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2% 아가로스 겔을 만들어 100 bp DNA ladder를 size marker로 하고 각 well에 PCR 산물 10 μ l씩을 넣어 100 V 일정전압으로 25분간 전기영동 하여 EtBr (etidium bromide)이 포함된 용액에 담고 20분간 방치시킨 후 증류수로 옮겨 겔 속에 포함된 EtBr의 잔여분을 제거하였다. UV transilluminator 위에서 특이적인 PCR 산물이 나타나는지 확인한 후, Gel Documentation System (UVitec, Cambridge, UK)을 이용하여 분석하였다. PCR 산물 밴드의 정량화는 100 bp DNA ladder marker가 같은 크기가 되도록 각각의 PCR 횟수, 온도, 시간을 조절하여 실시하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Targeted gene	Primer sequence	Product size
rat MMP-1	Forward primer 5'-GATTTGATGCTGCCACC-3'	72 bp
	Reverse primer 5'-GATGCCGTCTCCAGAAGTA-3'	
rat MMP-8	Forward primer 5'-TCCATTACTGATCTTCCTCCACACAC-3'	431 bp
	Reverse primer 5'-TTGTTGATGTCTGCTTCTCCCTGTAA-3'	
rat MMP-13	Forward primer 5'-CGGGAATCCTGAAGAAG-3'	72 bp
	Reverse primer 5'-AAGCCAAAGAAAGACTGC-3'	
rat GAPDH	Forward primer 5'-CATTCATCCTTGCCCTCTCA-3'	69 bp
	Reverse primer 5'-GGGCTGTCAGTCTTGAAA-3'	

면역조직화학염색

현재까지 sprague-dawley rats의 MMP-1, -8, -13에 특이적으로 반응하는 anti-MMP-1, -8, -13 antibody가 개발되지 않았기 때문에, MMP-1, -8, -13에 의한 조직소견의 변화를 보기 위해서는 MMPs에 의해서 분해되는 교원질과 MMPs를 억제하는 TIMP-1의 면역조직화학염색을 통하여 간접적으로 MMP-1, -8, -13에 의한 조직소견의 변화 양상을 파악할 수 있기 때문에 본 연구에서는 anti-collagen type I antibody와 anti-TIMP-1 antibody를 사용한 면역조직화학염색을 시행하였다.

Collagen type I (Colla)

파라핀 포매 조직으로부터 4 μm 두께의 절편을 얻어 코팅 슬라이드에 부착시킨 다음 60°C 오븐에 1시간 넣은 후 xylene으로 5분간 4회 반복 처리하여 탈파라핀 후 여러 단계의 알코올로 함수 후 증류수로 세척하였다. 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂ 용액에 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 4회 수세 후 조직 내 비특이적 결합을 억제하기 위해 blocking serum (goat immunocruz staining system, Santacruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 1시간 반응시킨 후 collagen type I (goat polyclonal sc-25974, Santacruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 일차 항체를 1 : 80의 비율로 희석하여 하룻밤 반응시켰다. 세척 완충액으로 수세한 다음 biotin이 label된 이차항체(goat immunocruz staining system, Santacruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1시간 반응시킨 후 세척 완충액으로 4회 수세하고 enzyme conjugate streptavidin (goat immunocruz staining system, Santacruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 반응시켰다. 다시 세척 완충액으로 4회 수세 후 AEC로 발색하고 증류수로 수세한 후 헤마톡실린으로 대조 염색하여 관찰하였다.

Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)

세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고 조직 내 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂에 5분간 반응 후 세척 완충액으로 4회 수세 후 1 : 40으로 희석한 일차항체 TIMP-1 mouse monoclonal (MAB3300, Chemicon, Bedford, MA, USA)을 밤새 반응시켰다. 4회 수세한 다음 HRP polymer (Zymed

Super PicTure 87-9963, San Francisco, CA, USA)를 30분간 반응시켰다. 이어서 세척완충액으로 4회 수세하고 DAB로 발색 후 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

연구성적

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis

Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)

MMP-1 mRNA의 상대적인 발현도는 실험군과 대조군 모두에서 실험 1일째에 비해 증가하는 양상을 보였다. 실험군에서는 4일째에 가장 활발한 발현을 보이다가 7일째와 14일째에 조금씩 감소하는 경향을 보인 반면에, 대조군에서는 실험 7일째에 가장 높은 발현을 보이다가 14일째 들어서 다시 감소하는 양상을 보였다 (Fig 1).

Matrix Metalloproteinase-8 (MMP-8)

MMP-8 mRNA의 상대적인 발현도는 MMP-1과는 달리 실험 1일째부터 실험군이 대조군에 비해서 더 많은 발현을 보였으며, 특히 4일째 실험군의 발현도는 대조군의 발현도보다 두 배 이상 발현되는 양상을 보였다. 발현도가 최대로 나타나는 양상은 MMP-1과 유사하게 실험군에서는 4일째에 최대치를, 대조군에서는 7일째에 최대치를 나타냈으며, 이후로는 각각 조금씩 발현도가 감소하는 결과를 보였다 (Fig 2).

Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13)

실험군에서는 실험 1일째에 가장 높은 발현을 보였다가, 실험 7일째에 다시 증가하였다가 감소하는 특이한 현상을 보였지만, 대조군에서는 MMP-1, MMP-8과 유사하게 실험 7일째에 가장 증가하였다가 다시 감소하는 발현 양상을 보였다 (Fig 3).

면역조직화학염색

Collagen type I

본 연구에서는 실험 1일째부터 실험군과 대조군에서 모두 압박측의 치주인대에 초자양조직이 관찰되기 시작하였으며, 파골세포(osteoclast, black triangular head indicator)가 관찰되기 시작하였다. 압박측의 섬유성 교원질은 실험군과 대조군 모두에

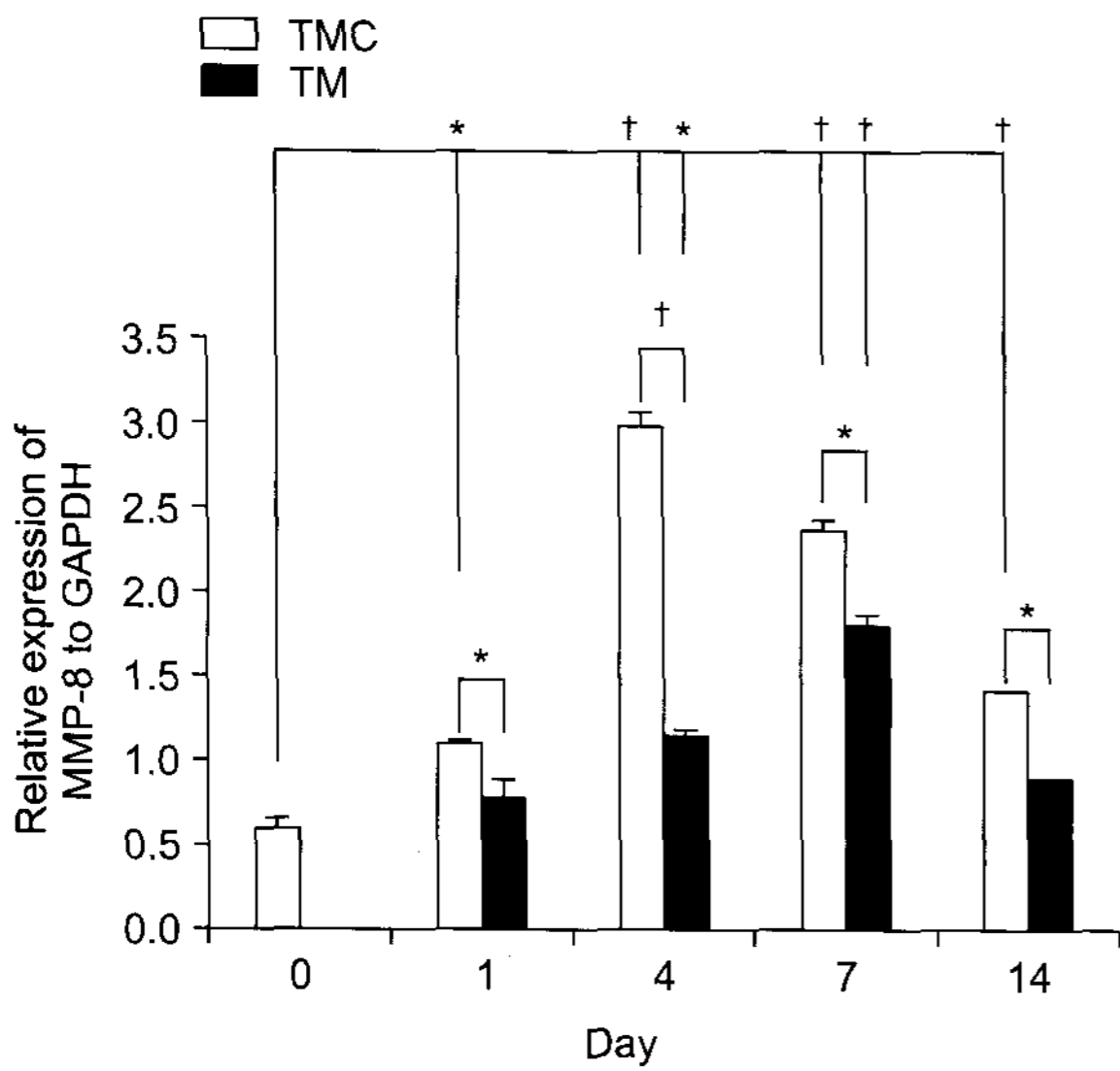


Fig 1. Densitometric results of MMP-8 expression from semi-quantitative RT-PCR between TMC and TM groups. There was a slight increase in the TMC group at day 4 than others. * $p < 0.05$, considered statistically significant, † $p < 0.01$, considered statistically significant under paired t test.

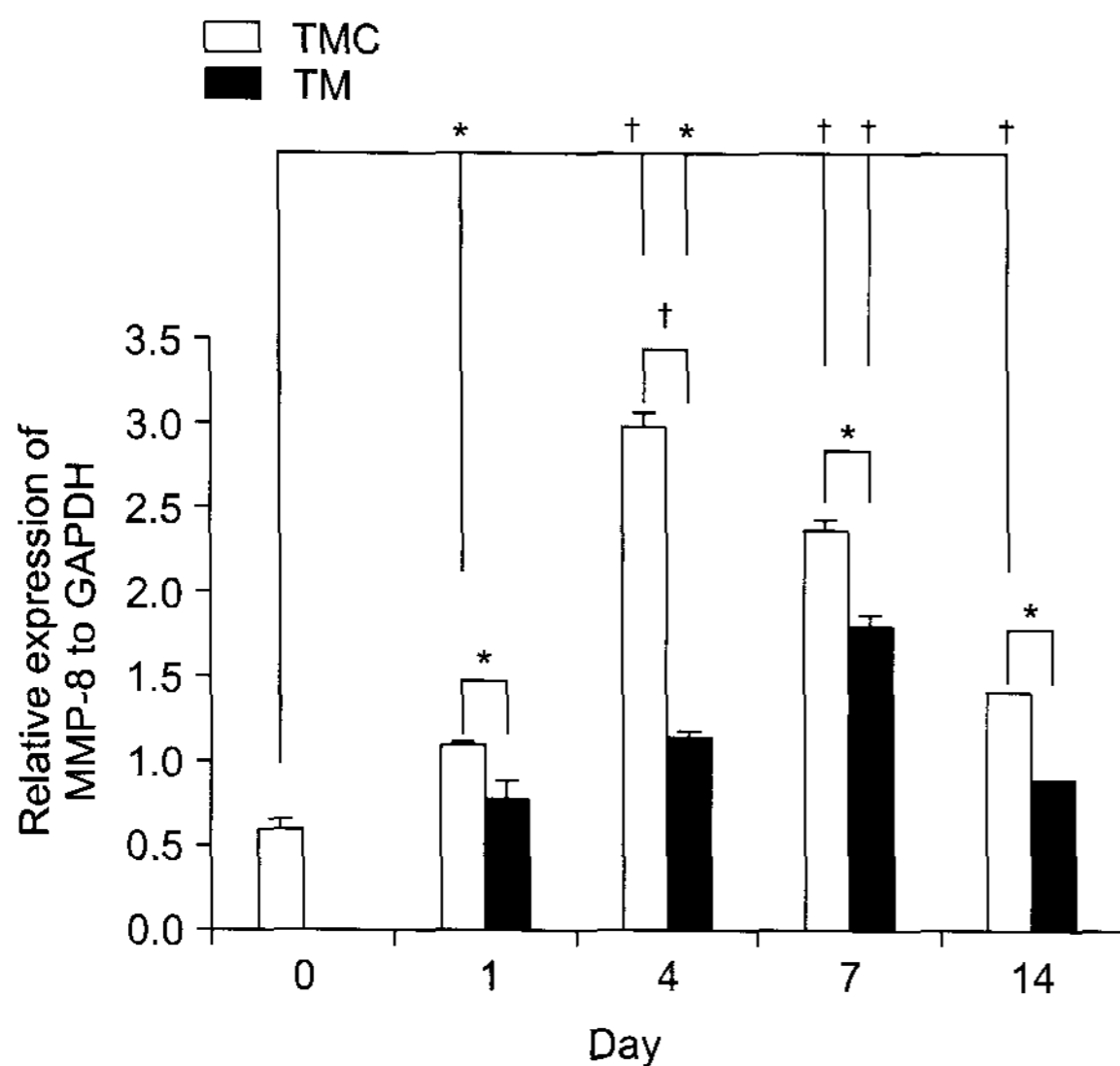


Fig 2. Densitometric results of MMP-8 expression from semi-quantitative RT-PCR between TMC and TM groups. MMP-8 expression of TMC group from day 4 were more intensive than that of TM group. * $p < 0.05$, considered statistically significant, † $p < 0.01$, considered statistically significant under paired t test.

서, 치면에서 치조골 방향으로 방사상으로 뻗어 있는 모양이 아니라 방향성을 잃고 눌러져 있는 양상을 보였다. 인장측에서는 실험군과 대조군 모두에

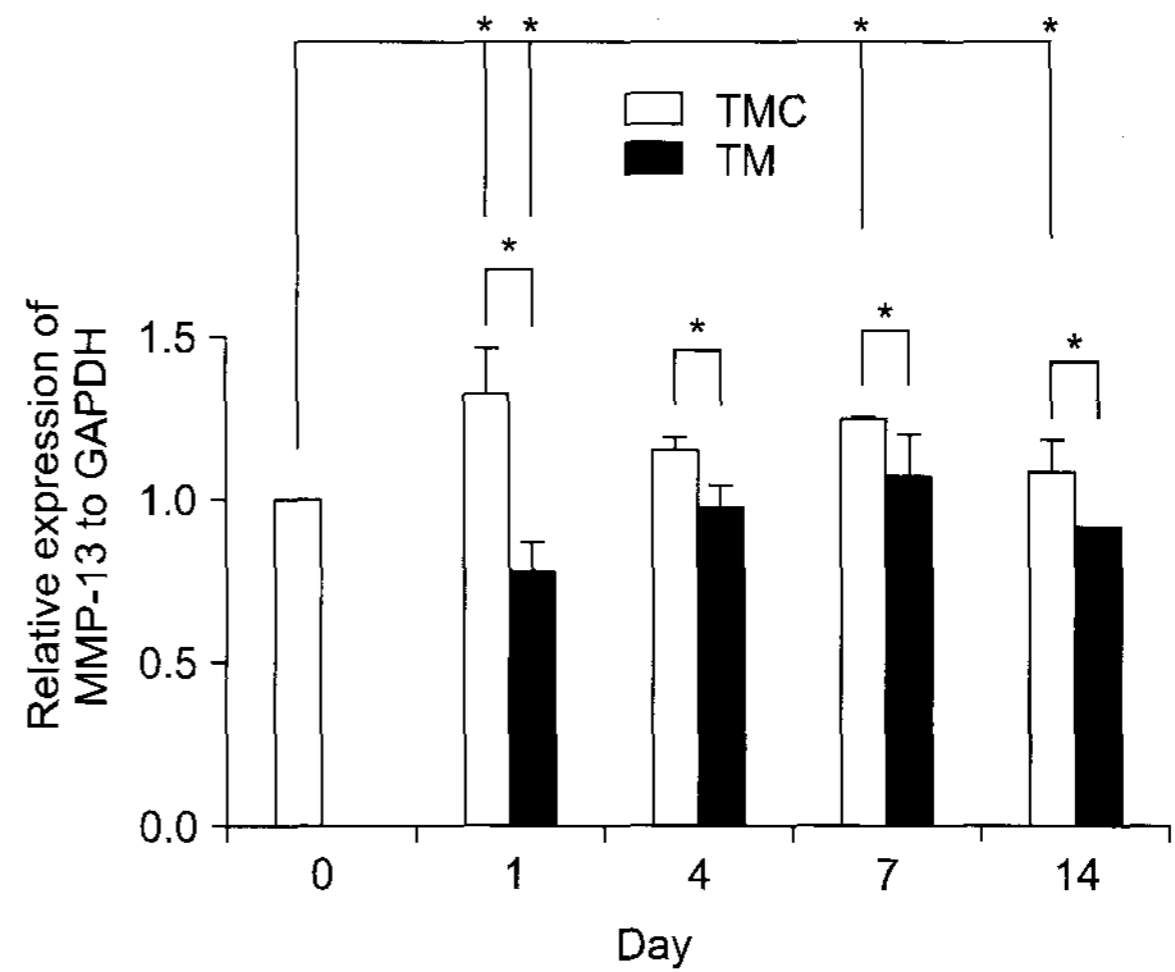


Fig 3. Densitometric results of MMP-13 expression from semi-quantitative RT-PCR between TMC and TM group. MMP-13 expression of TMC group increased more from day 1 than that of TM group. * $p < 0.05$, considered statistically significant under paired t test.

서 치주인대와 치조골의 경계에 쌀알 모양의 조골 세포(osteoblast, black diamond head indicator)가 줄지어 있는 것이 관찰되었다 (Fig 4, A-D).

실험 4일째에서는, 실험군의 압박측 인대의 초자양조직의 경계면의 섬유성교원질이 같은 부위의 대조군에 비해서 소실되고 섬유아세포가 성글게 나타나는 소견을 보였다 (Fig 4, E-H).

실험 7일째의 소견에서는, 실험군의 압박측 인대의 골경계면의 형태가 대조군의 압박측에 비해서 불규칙하게 나타났으나, 인장측 인대의 골경계면의 형태는 실험군과 대조군 모두 유사하였다 (Fig 4, I-L).

실험 14일째의 소견에서는, 실험군과 대조군 모두 압박측에서는 골경계면에 인접한 치주인대 부위에서 collagen type I의 염색 소견이 관찰되었다 (Fig 4, M-P).

Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)

전 실험기간에 걸쳐서 골경계면, 치주인대와 골 세포(osteocyte)에 실험군과 대조군에서 모두 염색된 소견을 보였다 (Fig 5).

실험 1일째의 소견에서, TIMP-1은 실험군과 대조군 모두 압박측과 인장측의 치주인대와 치조골의 경계면에서 발현되었다 (Fig 5, A-D). 그러나 실험 4일째의 압박측에서는 실험군보다 대조군에서 치주

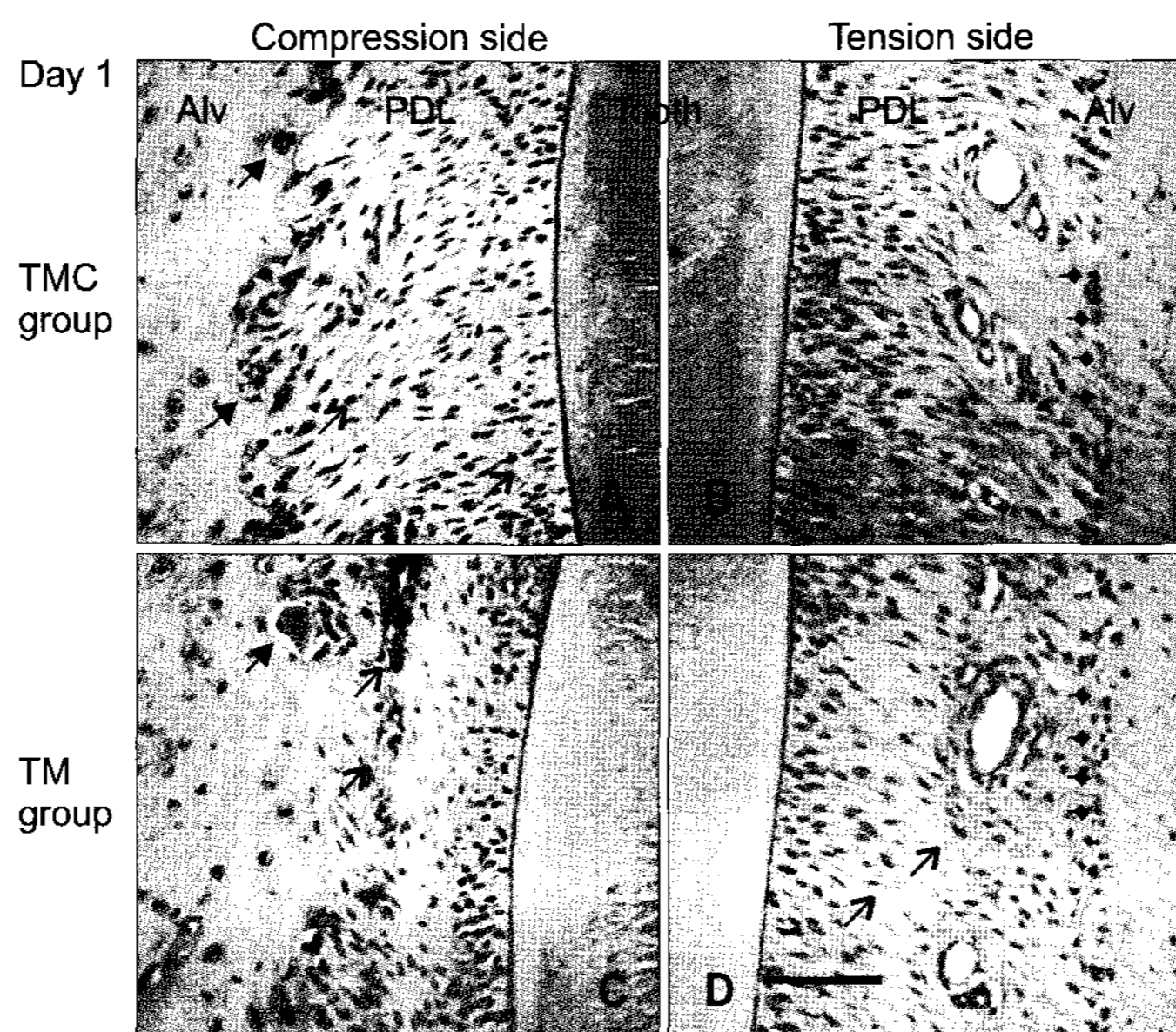


Fig 4. A-D, Collagen type I immunohistochemical staining. Light microscopy photographs of the horizontal section of rat incisor area (horizontal section, $4\ \mu\text{m}$ thick, original magnification $\times 400$). Compression side of TMC group at day 1 (A), tension side of TMC group at day 1 (B), compression side of TM group at day 1 (C), and tension side of TM group at day 1 (D). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). Alv, Alveolar bone; PDL, periodontal ligament; Tooth, tooth. Bar = $100\ \mu\text{m}$. Immunoreactivity is seen in the periodontal ligament stained by anti-Collagen type I antibody (black arrow).

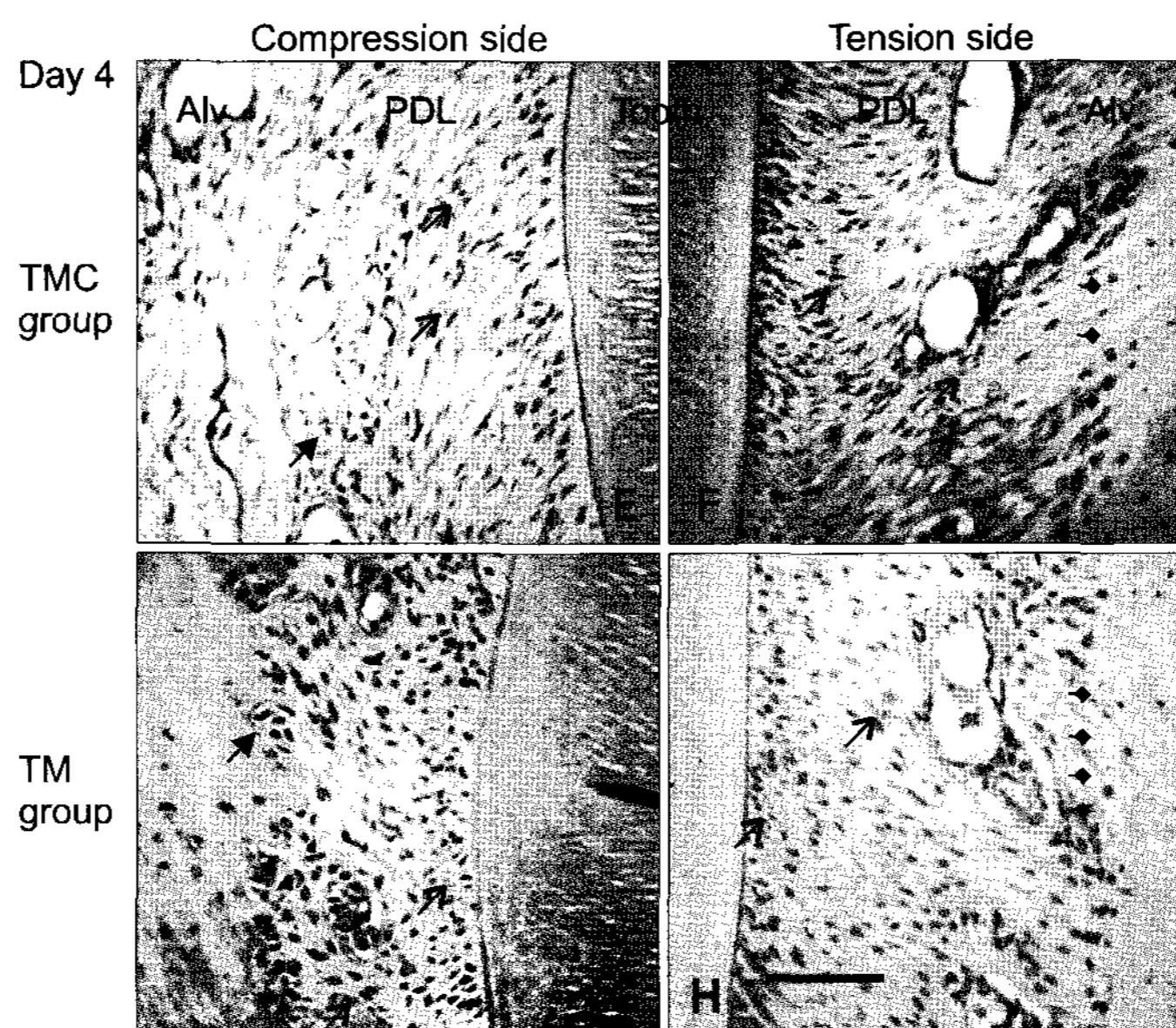


Fig 4. E-H, Compression side of TMC group at day 4 (E), tension side of TMC group at day 4 (F), compression side of TM group at day 4 (G), and tension side of TM group at day 4 (H). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). Alv, Alveolar bone; PDL, periodontal ligament; Tooth, tooth. Bar = $100\ \mu\text{m}$. Immunoreactivity is seen in the periodontal ligament stained by anti-Collagen type I antibody (black arrow). Perpendicular orientation of fibrillar collagen from tooth surface were broken at the compression side near bone surface at day 4 (E and G).

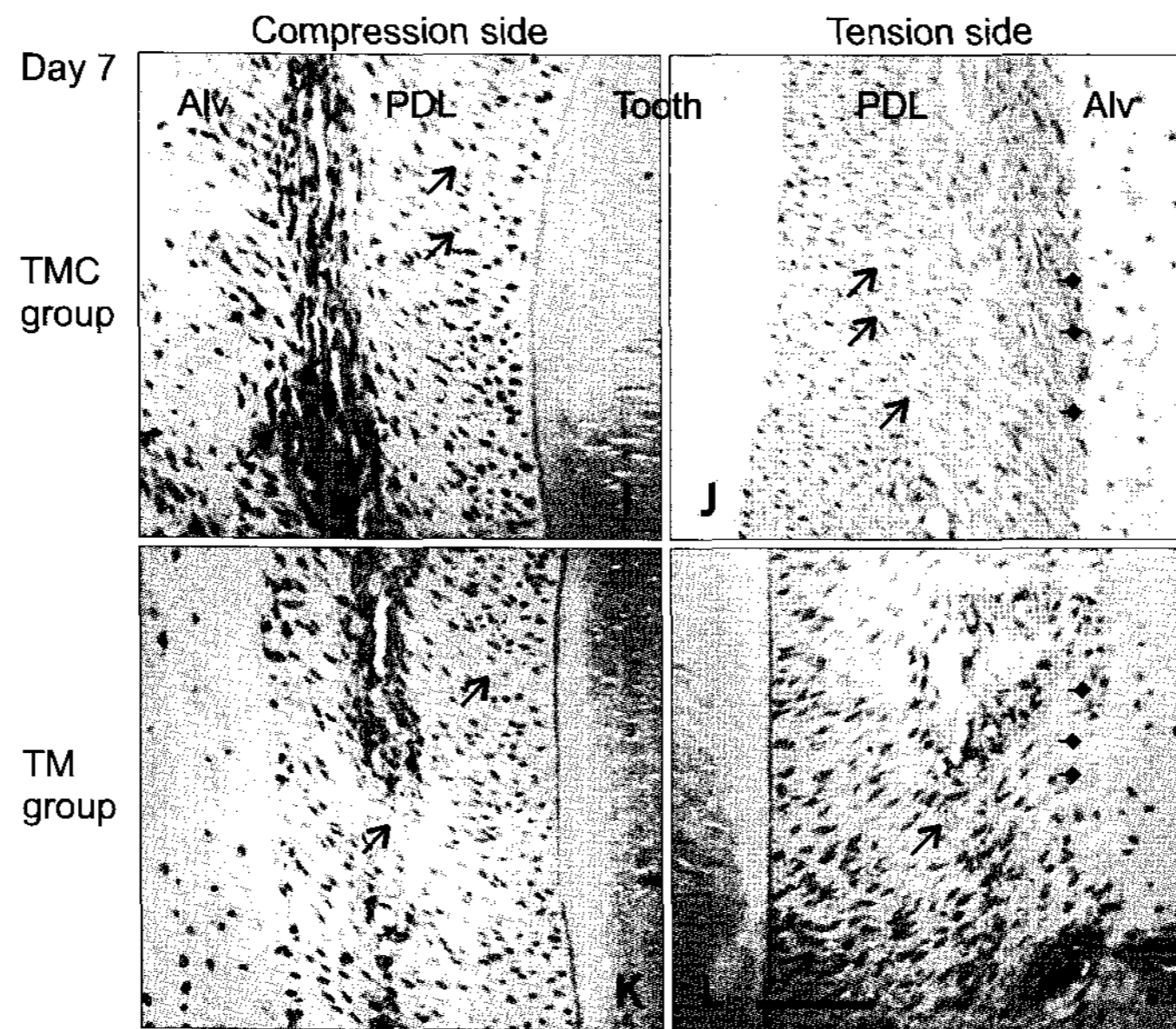


Fig 4. I-L, Compression side of TMC group at day 7 (I), tension side of TMC group at day 7 (J), compression side of TM group at day 7 (K), and tension side of TM group at day 7 (L). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). *Alv*, Alveolar bone; *PDL*, periodontal ligament; *Tooth*, tooth. **L**, Bar = 100 μ m. Immunoreactivity is seen in the periodontal ligament stained by anti-Collagen type I antibody (black arrow).

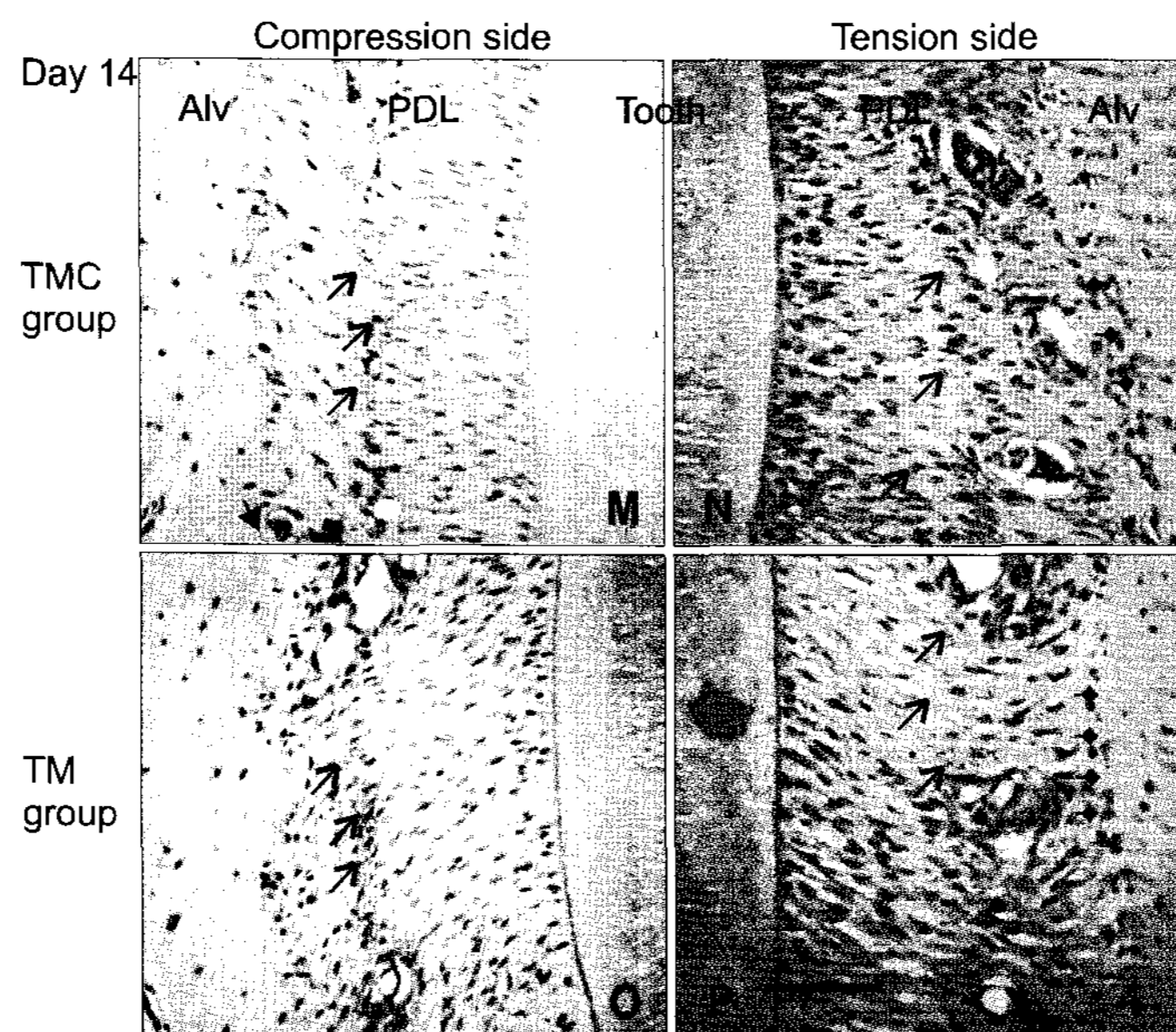


Fig 4. M-P, Compression side of TMC group at day 14 (M), tension side of TMC group at day 14 (N), compression side of TM group at day 14 (O), and tension side of TM group at day 14 (P). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). *Alv*, Alveolar bone; *PDL*, periodontal ligament; *Tooth*, tooth. **P**, Bar = 100 μ m. Immunoreactivity is seen in the periodontal ligament stained by anti-Collagen type I antibody (black arrow).

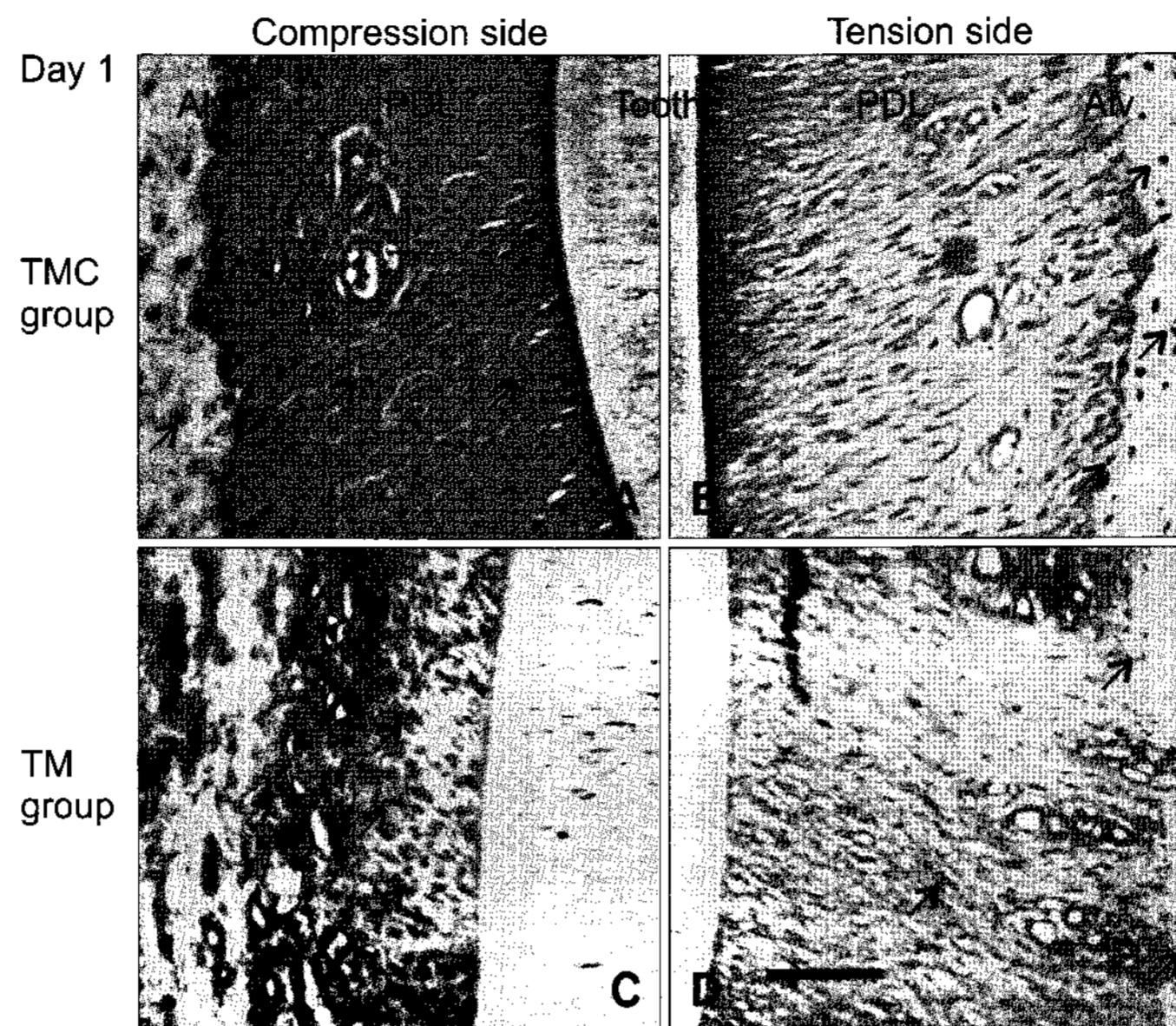


Fig 5. A-D, TIMP-1 immunohistochemical staining photomicrographs of horizontal sections of maxillary incisors from TMC group and TM group (horizontal section, $4\mu\text{m}$ thick, original magnification $\times 400$). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). *Alv*, Alveolar bone; *PDL*, periodontal ligament; *Tooth*, tooth. **D,** Bar = $100\mu\text{m}$. Immunoreactivity is seen in the alveolar bone and periodontal ligament stained by anti-TIMP-1 antibody (*black arrow*). TIMP-1 stained in the periodontal ligament cells and perivascular cells in both TMC and TM groups.

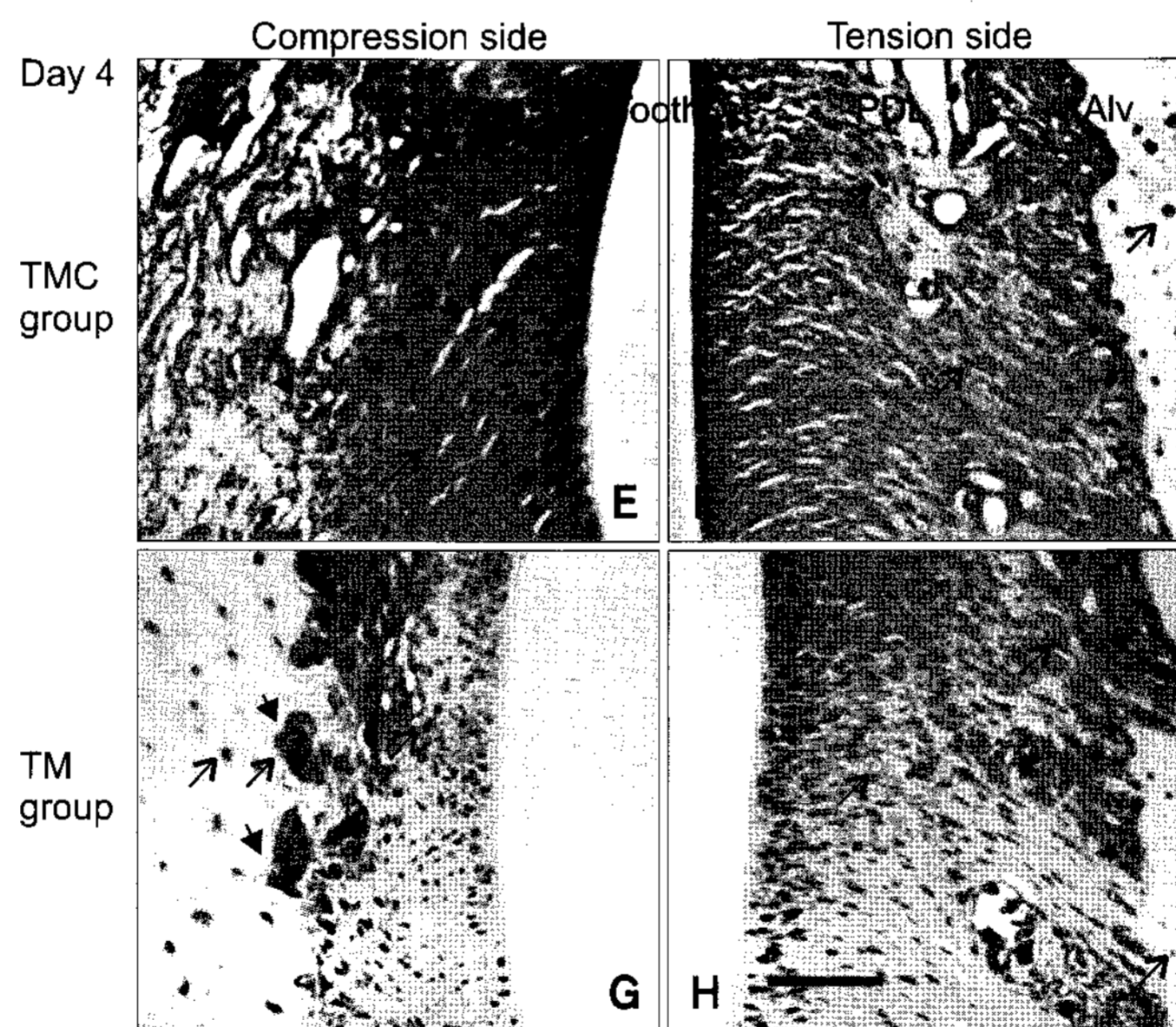


Fig 5. E-H, Compression side of TMC group at day 4 (**E**), tension side of TMC group at day 4 (**F**), compression side of TM group at day 4 (**G**), and tension side of TM group at day 4 (**H**). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). *Alv*, Alveolar bone; *PDL*, periodontal ligament; *Tooth*, tooth. **H,** Bar = $100\mu\text{m}$. Immunoreactivity is seen in the alveolar bone and periodontal ligament stained by anti-TIMP-1 antibody (*black arrow*). Expression of TIMP-1 in TM group was more intensive than that of TMC group from day 4 (**G** and **H**).

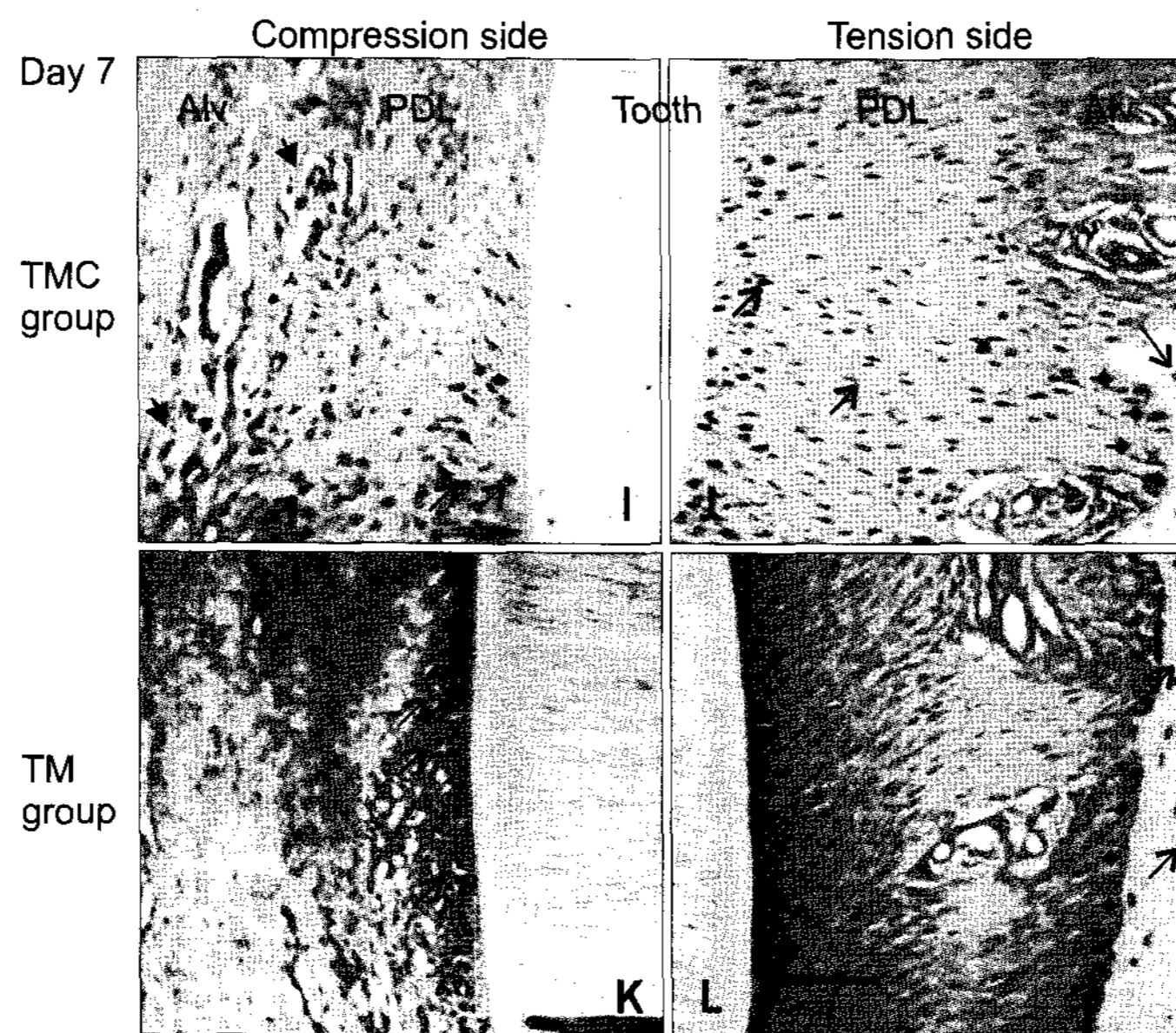


Fig 5. I-L, Compression side of TMC group at day 7 (I), tension side of TMC group at day 7 (J), compression side of TM group at day 7 (K), and tension side of TM group at day 7 (L). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). *Alv*, Alveolar bone; *PDL*, periodontal ligament; *Tooth*, tooth. **L**, Bar = 100 μ m. Immunoreactivity is seen in the alveolar bone and periodontal ligament stained by anti-TIMP-1 antibody (*black arrow*). TIMP-1 stained in the periodontal ligament cells and perivascular cells in both TMC and TM groups.

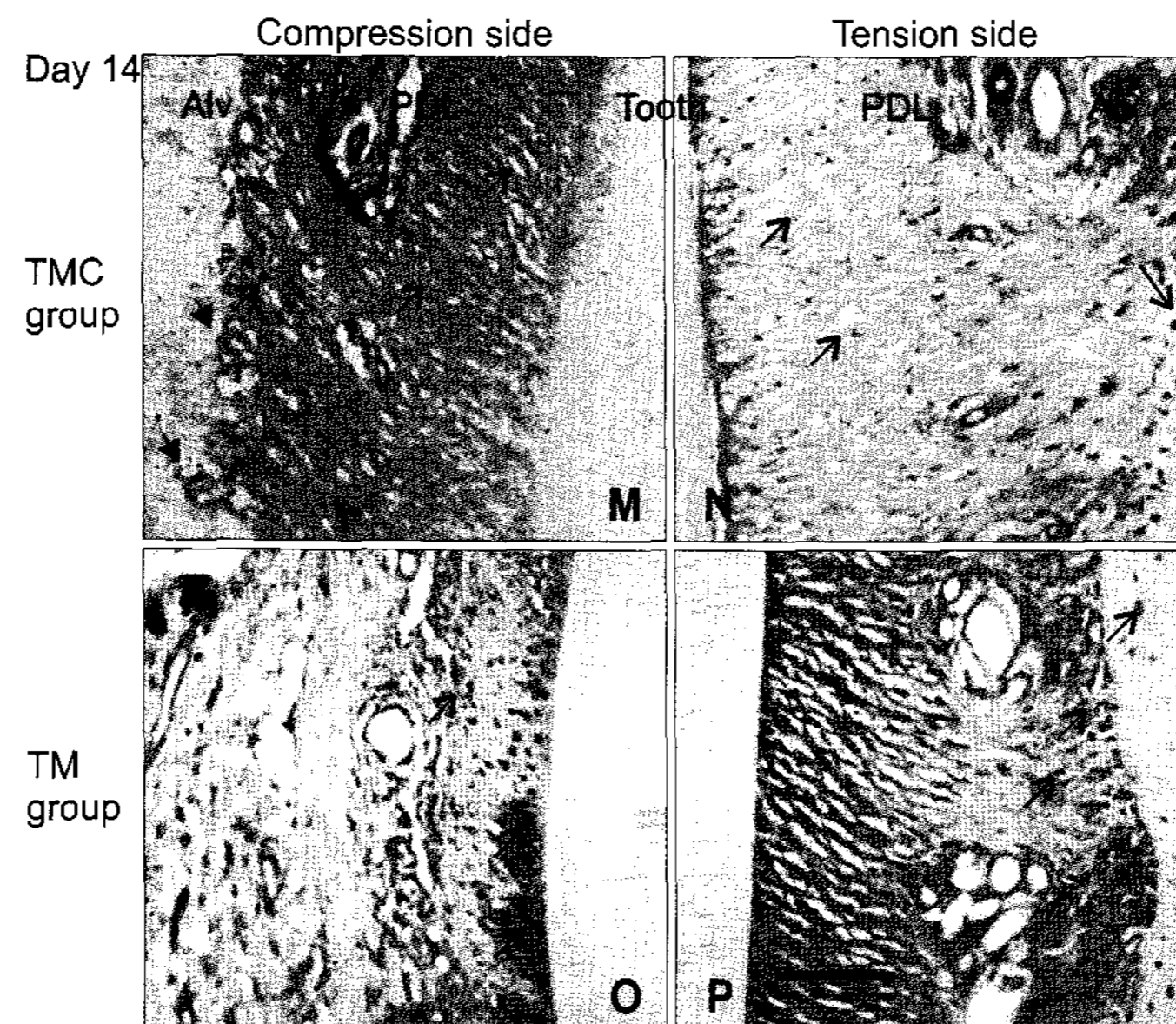


Fig 5. M-P, Compression side of TMC group at day 14 (M), tension side of TMC group at day 14 (N), compression side of TM group at day 14 (O), and tension side of TM group at day 14 (P). Osteoclast (black triangular head indicator), osteoblast (black diamond head indicator). *Alv*, Alveolar bone; *PDL*, periodontal ligament; *Tooth*, tooth. **P**, Bar = 100 μ m. Immunoreactivity is seen in the alveolar bone and periodontal ligament stained by anti-TIMP-1 antibody (*black arrow*). TIMP-1 stained in the periodontal ligament cells and perivascular cells in both TMC and TM groups.

인대와 치조골의 골세포에서 좀 더 균일한 염색 소견을 보였다 (Fig 5, E-H). 실험 7일째에는 실험군과 대조군 모두 치주인대와 치조골의 경계에 있는 파골세포와 일부 치주인대에서 염색된 소견이 보였다 (Fig 5, I-L). 실험 14일째에는 실험군에서 압박측의 골과 치주인대의 경계면에 있는 파골세포에서 TIMP-1이 발현되는 것으로 관찰되었지만, 대조군은 압박측의 치근면에 인접한 치주인대에서 TIMP-1의 염색소견이 관찰되었다 (Fig 5, M-P).

고찰

교정치료는 치아에 기계적인 힘을 적용함으로써 생성된 자극이 치주인대와 치조골에 생물학적인 반응을 연속적으로 일으켜서 나타나는 현상이다. 치아 주위 조직에 위대한 영향을 주지 않고 생리적인 한계 내에서 원하는 치아이동을 얻기 위해서는 장기간의 치료 과정이 소요된다는 한계점이 존재한다. 따라서 많은 연구자들이 전체 교정 치료기간을 줄일 수 있는 방법들을 고안하고 연구해왔다.

효율적인 치아이동을 얻기 위한 노력으로서, prostaglandin E₂, vitamin D (1,25-(OH)₂D₃), parathyroid hormone (PTH) 등의 약물을 이용한 생화학적 방법에 대한 연구들이 시도되어 왔다. 또 외과적인 방법을 동반한 corticotomy-facilitated orthodontics를 통하여 빠른 치아이동을 얻고자 하는 노력들이 시도되고 있다.¹⁴⁻¹⁶ 최근에는 저출력 레이저(low-level laser)를 이용해서 치아와 주위 조직에 부작용을 일으키지 않고 효율적인 치아이동을 얻을 수 있는지에 대한 연구들도 많이 시도되었다. Kana 등¹⁷과 Mester 등¹⁸이 저출력 레이저가 상처의 치유를 촉진시킨다는 연구를 발표하였고, Bosatra 등¹⁹과 Lam 등²⁰은 저출력 레이저가 교원질의 합성을 촉진시킨다고 하여 저출력 레이저가 조직반응을 향상시킨다고 주장하였다. 하지만 아직도 조직반응의 향상과 치아이동의 상관관계에 대한 명백한 결론은 제시되지 않은 상태이다. 따라서 치아이동 시에 나타나는 골조직의 교체에 대한 생물학적인 기전을 이해할 필요가 있다.

교정적인 치아이동 동안에 치주인대에서 나타나는 생물학적인 반응들에 대한 많은 연구가 있었는데, 최근 들어서 주목받고 있는 것이 osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kB (RANK), receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) 등의 사이토카인들이다. 치주인대세포는 이들 사이

토카인 중 RANKL을 발현함으로써 파골세포를 집적시키는 데 중요한 역할을 하며, OPG는 파골세포의 발생에 대한 길항제로서 작용하고, RANK는 파골세포의 표면에서 RANKL의 부착과 관련되어 나타난다.⁹

그러나 이들 사이토카인에 대한 연구들은 골조직의 재형성 과정에 관련된 조골세포와 파골세포의 작용을 설명할 수는 있지만, 치아의 위치변화가 나타나기 위해서 필요한 치주인대조직 자체의 재형성에 대한 설명을 하기에는 어렵다는 단점이 있다. 따라서 치주인대조직을 구성하는 교원섬유와 세포의 기질에 대한 이해가 필요하다.

치주인대는 주로 치아 위치에 대해서 역동적인 기계적인 안정성을 주는 형태로 치아의 치근에서 치조골에 연결되는 주로 I형 교원질(interstitial collagen type I, col-1)과 III형 교원질(collagen type III) 등의 세포외 기질과 섬유아세포, 상피 세포와 거대 세포 등을 포함하는 다군집 세포의 복잡한 네트워크로 구성되어 있다. 이들 각각의 세포들은 fibrillar collagen을 형성한다든가, 혈류를 공급하고 염증 반응을 억제하는 등을 통해서 치주인대 조직을 유지하는 데 도움을 준다. 교원섬유(collagen fiber)는 치은의 세포외 기질의 주요한 구성분으로 전체 조직 단백질의 대략 60% 정도를 차지하고 있다. 보통, 치은은 I형 교원질이 90%, III형 교원질이 8%, IV형, V형, VI형, 그리고 VIII형 교원질 등이 2% 정도를 차지하고 있다. 치주인대 내에서 결합조직의 중요한 특성은 세포외 기질 구성분이 지속적으로 재생산된다는 것으로서, 여태까지 연구된 모든 결합조직 중에서 가장 빠른 교원성 단백질의 교체를 나타낸다. 백서를 이용한 실험에서 치주인대 교원질의 반감기는 1 - 5일 정도로 나타났으며, 이것은 피부 조직에서보다 상당히 빠른 과정이다. 이런 급속한 재생산은 기능하는 동안의 치아의 위치적인 적응을 허용하기 위해서 상당히 중요한 것으로서, 치주인대가 치열궁 내에서 치아의 맹출과 순간적인 위치 이동 같은 과정을 수행하면서 동시에 강한 고정을 유지하는 것이 가능하다는 것을 나타내고 있다.²¹⁻²⁴

치주인대에서 교원질의 대사는 정확하게 합성과 분해 사이에 균형을 이루면서 조절되고 있다. 교원질의 분해는 세포 외와 세포 내의 서로 다른 두 가지 경로를 통해서 일어나며, 특히 MMP가 중요한 작용을 하는 것으로 밝혀졌다.²⁵

정상적인 생리적인 환경에서의 교원질의 식세포 작용은 주로 섬유아세포 내에서 일어나는 일차 교

원질의 분해와 세포 외에서 일어나는 이차 교원질 분해로 구성된다.²⁶⁻³⁰ 세포 내의 lysosomes이 산성 pH 조건에서 활성화되는 cycteine proteinases를 분비하여 교원질의 분해를 진행시킨다.^{31,32} 이 과정에서 TGF- β 는 교원질의 식세포작용을 증가시키는 반면에, IL-1 α 는 식세포작용을 억제시키는 사이토카인들로 밝혀졌으며, 이런 사이토카인의 조합이 서로를 길항하는 것으로 밝혀졌다.^{33,34} 이후에 세포외 교원질 분해는 Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)에 의해서 주로 이루어진다. MMP-1은 interstitial collagenase 또는 collagenase-1이라고도 불리며 섬유아세포 등의 결합조직세포와 거대세포에 의해서 광범위하게 합성되고 분비되며 정상적인 조직의 재형성과 좀 더 연관이 깊고 주로 III형 교원질을 가수분해한다.^{35,36} 치주병 같은 병적인 상황에서는 합성과 분해 사이의 섬세한 균형이 방해받는다. 세균 산물이 염증을 유발시키며, 염증 반응에 관여하는 세포들이 여러 사이토카인과 단백질 분해 효소를 생성시키고 유리시키는 숙주 반응을 일으키게 된다. 이런 병적인 상황에서 일어나는 교원질의 분해 과정은 metalloproteinase-mediated extracellular digestion이라고도 하며, 주로 MMP-8과 MMP-13이 깊은 관여를 하는 것으로 알려져 있다.^{37,38} MMP-8은 human neutrophil collagenase 또는 collagenase-2라고도 불리며 다핵거대백혈구(polymorphonuclear leucocytes)와 치은 섬유아세포, 골세포 같은 특정한 비침윤성 세포에 의해서 생성된다. MMP-8은 I형 교원질을 가수분해하는 효소이며 염증이 있는 인간 치은에서의 주요한 간질 교원질 분해효소이다. MMP-13은 성인과 국소적 유년성 치주염 환자의 치주조직의 치주낭 상피 세포, 치은 섬유아세포, 단핵구와 거대세포 등이 유리하는 것으로 밝혀져 있으며, 주로 II형 교원질을 분해하는 것으로 알려져 있다.³⁹⁻⁴²

그러나 최근에 MMP-1, -8, 그리고 -13은 in vitro 실험에서 정상적인 교원질의 분해 과정에서 모두 관찰되는 것으로 밝혀졌으며, 실제로 치아의 정상적인 맹출 과정에서 MMP-8이 섬유아세포에서 분비된다는 것이 밝혀지기도 하였다.⁴³ MMP는 zinc ion-dependent proteolytic enzyme로서 세포외 기질의 분해와 재형성에 기여하는 최소 25가지 정도의 단백질분해효소의 유전자 집단의 하나이다. 이들은 collagenases (MMP-1, -8, and -13), gelatinases (MMP-2, -9), stromelysins, membrane type MMP 등의 몇 가지 subgroup으로 나눌 수 있다.⁴⁴ MMPs는 상대적으로 다른 단백질분해효소에 대해 저항성이 있는 교원질

분자의 triple helical body의 일부를 zinc와 calcium ions의 존재하에 분리시켜서, N-terminal 3/4와 C-terminal 1/4조각을 만들게 된다.^{45,46} MMP의 작용은 생성, 활성과 억제를 포함하는 서로 다른 세 가지의 수준에서 조절이 된다. 첫째로, 효소는 불활성화되어 있는 proform으로 합성되고 분비된다. 두 번째로, 효소는 MMP-3 (stromelysin) 또는 plasmin의 자가 반응에 의해서 활성화된다. 세 번째로 한 번 활성화되면 효소는 이화작용을 수행하며, 어느 정도 교원질의 분해가 이루어짐과 동시에 특정한 Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)에 의해서 지속적으로 억제된다.^{47,48}

이상의 연구들을 토대로 본 연구에서는 치아가 기계적인 자극을 받았을 때 일어나는 치주인대의 교원질의 대사에서의 변화에 대하여 알아보려고 시행하게 되었다.

피질골 천공을 동반하는 교정적인 치아이동을 시행한 실험군(TMC group)과 교정적인 치아이동만 시행한 대조군(TM group)의 조직에서 치주인대의 세포외 기질 중에서 가장 많은 양을 차지하는 I형 교원질의 발현 양상을 면역조직화학염색으로 확인하였다. 실험 1일째의 I형 교원질의 염색 양상은 실험군과 대조군 모두 큰 차이를 보이지 않고 있다 (Fig 4, A-D). 그러나 실험 4일째에서는, 실험군의 압박측 인대의 초자양조직의 경계면의 섬유성교원질이 같은 부위의 대조군에 비해서 소실되고 섬유아세포가 성글게 나타나는 소견을 보인다 (Fig 4, E and F). 인장측의 섬유성 교원질은 실험군이 대조군에 비해서 좀 더 많은 발현을 보이고 있다 (Fig 4, G and H). 실험 7일째의 소견에서는, 실험군의 압박측 인대의 골경계면의 형태가 대조군의 압박측에 비해서 가장 불규칙하게 나타나고 있으나, 인장측 인대의 골경계면의 형태는 실험군과 대조군 모두 유사하게 나타나고 있다 (Fig 4, I-L). 실험 14일째의 소견에서는, 실험군과 대조군 모두 골경계면의 형태가 미처치 대조군의 상태와 유사한 양상을 보이지만, 파골세포는 아직도 골면에서 다수 관찰되고 있다 (Fig 4, M-P, black triangular head indicator).

면역조직화학염색 소견의 결과를 정량화하여 비교하기 위하여 MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13의 semiquantitative RT-PCR을 시행하였다. 본 연구에서 MMP-1과 MMP-8의 mRNA의 상대적인 발현도는 실험군에서 실험 1일째부터 상대적으로 조금씩 높게 발현되는 양상을 보였으며 4일째에 가장 높은 발현을 보이다가 7일째와 14일째에 조금씩 감소하

는 경향을 보인 반면에, 대조군에서는 실험 7일째에 가장 높은 발현을 보이다가 14일째 들어서 다시 감소하는 양상을 보였다 (Figs 1 and 2). 특히 MMP-8의 경우에는 실험 4일째에 실험군의 발현도가 대조군에 비해서 두 배 이상 높게 나타났는데 (Fig 2), 이는 I형 교원질이 활발하게 분해되고 있다는 것을 의미한다. 그러나 이렇게 두 배 이상의 발현도를 보이는 것이 염증성의 비가역적인 반응은 아닌 것으로 판단되는데, 그 이유는 실험 14일째가 되면서 실험군과 대조군의 발현도가 거의 유사하게 나타나며 이의 수준이 미처치 대조군과 유사하게 나타나기 때문이다. 본 연구에서 실험 14일째의 조건은, 백서의 치주조직의 재형성 주기가 인간의 약 1/3에 해당하므로, 인간의 경우에는 약 5 - 6주 정도가 지났을 때의 현상과 유사할 것이다. 치아이동을 시행한 후 약 한 달 정도의 시간이 지나면, 치주조직의 원래의 형태를 유지하고 있다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 사람에게 있어서 RAP는 수술 시행 후 약 3 - 4 주 정도가 경과되었을 때부터 관찰할 수 있는 현상이라는 Frost⁴⁶의 주장에 따르면, 본 연구에서 나타난 MMP-1과 MMP-8의 최대 발현 시기가 RAP에서 나타나는 시기와는 달랐는데, 이는 아마도 Frost의 연구가 골조직에 국한된 것이었기 때문으로 생각한다. 본 연구의 면역조직화학염색 소견의 결과에서도 실험 14일째까지 실험군의 압박측의 골경계면에서 파골세포가 관찰되고 있었다 (Fig 4-M, black triangular head indicator). 다시 말해서, 골조직의 경우에는 파골세포의 활성이 그대로 남아서 피질골의 다공성을 유지하고 있지만, 치아와 골조직을 연결하는 연조직성 결합조직의 경우에는 빠른 교체를 통해서 적절한 형태를 유지해야 전체적인 치아의 안정성이 확보될 수 있기 때문에 실험군과 대조군 모두 미처치 대조군에 비해서 MMP-1과 MMP-8이 조기에 높은 발현도를 보였다가 다시 정상 수준으로 유지되었던 것으로 판단된다. Redlich⁴⁹도 기계적인 자극을 가하였을 때 MMP-1의 발현이 증가하지만, 병적인 현상은 아니라고 하였으며, Takahashi 등⁴³도 백서의 치아이동 시에 MMP-8의 발현이 증가한다고 하여, 본 연구 결과와 일치하는 사실을 보여주었다.

TIMP-1은 골 경계면과 치주인대, 그리고 치조골의 골세포(osteocyte)에서 발현되는 MMP를 억제하는 효소이다. 실험 1일째의 소견에서, TIMP-1은 실험군과 대조군 모두 압박측과 인장측의 치주인대와 치조골의 경계면에서 발현되어 있다 (Fig 5, A-D).

그러나 실험 4일째의 압박측에서는 실험군보다 대조군에서 치주인대와 치조골의 골세포에서 좀 더 균일한 염색 소견을 보이고 있는데, 이는 대조군에서 실험군보다 MMP에 대한 억제 반응이 더 활발하게 일어난다는 것을 의미하며, Holliday 등⁵⁰이 백서에서 TIMP-1이 파골세포의 활성과 교정적인 치아 이동을 억제한다고 한 실험 결과와도 일치하는 것이다 (Fig 5, E-H). 실험 14일째에는 실험군에서는 지속적인 파골세포의 활성이 관찰되지만, 대조군에서는 오히려 치근면에 인접한 치주인대에서 많이 염색되어 있는 소견을 관찰할 수 있었는데, 이는 실험군은 RAP에 의해서 골의 지속적인 재형성 과정이 유지되는 반면에 대조군은 정상적인 생리적 환경을 회복하였기 때문으로 생각한다 (Fig 5, M-P).

MMP-13의 mRNA 발현도는 MMP-1, -8과는 다르게 실험군에서 실험 1일째에 가장 높은 발현을 보였다가, 실험 7일째에 다시 증가하였다가 감소하는 특이한 현상을 보였지만, 대조군에서는 MMP-1, MMP-8과 유사하게 실험 7일째에 증가하였다가 다시 감소하는 발현 양상을 보였다 (Figs 1 and 2). MMP-13이 실험군에서 초기에 급작스런 증가를 보였다가 다시 감소하면서 다른 MMP와 유사한 발현 양상을 보이는 이유는 아마도 MMP-13이 주로 치주염 환자의 치주조직의 치주낭 상피 세포, 단핵구와 거대세포 등에서 유리되는 염증성 반응에서 나타난다는 사실과 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. 실험군은 피질골 천공으로 인해서 초기에 강한 염증성 반응이 유도되지만 지속적인 세균 산물이나 치주낭의 형성이 이루어지지 않으므로, 곧 정상적인 수준을 유지하는 것으로 판단된다. 또, 대조군의 경우에는 실험 1일째에는 오히려 미처치 대조군에 비해서 더 낮은 MMP-13 mRNA의 발현도를 보였다. 이는 Takahashi 등⁴³이 백서의 실험적인 치아이동에서 치아이동을 시행한 실험군의 압박측에서 정상군보다 오히려 MMP-13의 발현이 더 낮게 나타난다고 보고한 것과 유사한 결과였다. 그러나, 본 연구의 RT-PCR은 인장측과 압박측을 분리한 것이 아니라 개체 전체의 결과이기 때문에, Takahashi 등⁴³의 실험 결과와 같은 것이라고 판단하기 어려운 점이 있으며, 더구나 실험군에서는 오히려 더 높게 나타나는 부분에 대한 설명도 하기 어려웠기 때문에 이에 관해서는 차후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론

본 연구는 피질골 천공을 동반한 교정적인 치아이동이 통상의 교정적인 치아이동과 조직 재형성의 정도에 차이가 존재하는지 알아보기 위하여 백서 33마리를 피질골 천공을 동반한 치아이동 실험군(TMC group)과 단순 치아이동 대조군(TM group)으로 나누어 실험하였다. 모든 실험동물에 20 gm 이하의 힘으로 전치부를 이개시키는 치아이동을 시행하였으며, 치주조직의 재형성에 관련된 단백질분해효소의 발현을 알아보기 위해서 MMP-1, -8, 그리고 -13 효소의 RT-PCR을 시행하였으며, I형 교원질(collagen type I)과 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)의 면역조직화학염색(immunohistochemistry)을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MMP-1의 mRNA는 실험군에서는 4일째에 가장 활발한 발현을 보이다가 7일째와 14일째에 조금씩 감소하는 경향을 보인 반면에, 대조군에서는 실험 7일째에 가장 높은 발현을 보이다가 14일째 들어서 감소하는 양상을 보였다.
2. MMP-8의 mRNA는 실험 1일째부터 실험군이 대조군에 비해서 더 많은 발현을 보였으며, 특히 4일째의 실험군에서는 대조군보다 두 배 이상 발현되었다.
3. MMP-13의 mRNA는 실험 1일째의 실험군에서 가장 높은 발현도를 보였으며, 대조군에서는 오히려 미처치 대조군에 비해 더 낮게 발현되었다.
4. I형 교원질의 면역조직화학염색 결과는 실험 4일째부터 실험군의 압박측에서 대조군보다 교원질의 염색 정도가 적게 나타났다.
5. TIMP-1은 실험 4일째에는 대조군의 압박측에서 발현이 관찰되었지만, 실험 14일째에는 실험군의 압박측의 골과 치주인대의 경계면에 있는 파골세포에서 발현되었으며, 대조군에서는 압박측의 치근면에 인접한 치주인대에서 TIMP-1의 발현이 관찰되었다.

이상의 실험 결과를 볼 때 피질골 천공은 백서의 실험적 치아이동에 있어 치주인대와 치조골 결합조직의 재형성 속도를 증가시키는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Yamasaki K, Shibata Y, Fukuhara T. The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). J Dent Res 1982;61:1444-6.
2. Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Kobayasi Y, Yamashiro T, Sakuda M. The effect of local application of 1,25-dihydroxycholecalciferol on osteoclast numbers in orthodontically treated rats. J Dent Res 1992;71:53-9.
3. Soma S, Yamashita K, Matsumoto S, Takada K. Effect of continuous infusion of PTH on orthodontic tooth movement. J Jpn Orthod Soc Abstr 1997.
4. Frost HM. The regional accelerated phenomenon. Orthop Clin North Am 1981;12:725-6.
5. Frost HM. The regional acceleratory phenomenon: a review. Henry Ford Hosp Med J 1983;31:3-9.
6. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. Anat Rec 1990;226:414-22.
7. Kole H. Surgical operations on the alveolar ridge to correct occlusal abnormalities. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1959;12:515-29.
8. Wilcko WM, Wilcko T, Bouquot JE, Ferguson DJ. Rapid orthodontics with alveolar reshaping: two case reports of decrowding. Int J Periodontics Restorative Dent 2001;21:9-19.
9. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev 2004;15:49-60.
10. Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. Biopolymers 2002;66:19-32.
11. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev 2000;14:2123-33.
12. Tsubota M, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Shimauchi H. Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption. J Dent Res 2002;81:673-8.
13. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and proposed solution. Eur J Orthod 2004;26:483-90.
14. Pfeifer JS. The reaction of alveolar bone to flap procedures in man. Periodontics 1965;3:135-40.
15. Anholm JM, Crites DA, Hoff R, Rathbun WE. Calif Dent Assoc J 1986;14:7-11.
16. Gantes B, Rathbun E, Anholm M. Effects on the periodontium following corticotomy-facilitated orthodontics. Case reports. J Periodontol 1990;61:234-8.
17. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. Arch Surg 1981;116:293-6.
18. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. Lasers Surg Med 1985;5:31-9.
19. Bosatra M, Jucci A, Olliaro P, Quacci D, Sacchi S. In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. An electron microscopic study. Dermatologica 1984;168:157-62.
20. Lam TS, Abergel RP, Meeker CA, Castel JC, Dwyer RM,

- Uitto J. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Lasers Life Sci* 1986;1:61-77.
21. Rygh P. The periodontal ligament under stress. In: Norton LA, Burstone CJ, editors. *The biology of tooth movement*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989. p. 9-28.
 22. Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Saeki S, Mitani H. Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1998;114:8-14.
 23. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001;80:887-91.
 24. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 2002;17:210-20.
 25. Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Arch Oral Biol* 1999;44:907-15.
 26. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Critic Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
 27. Beertsen W, Everts V. The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Anat Rec* 1977;189:479-97.
 28. Beertsen W, Brekelmans M, Everts V. The site of collagen resorption in the periodontal ligament of the rodent molar. *Anat Rec* 1978;192:305-17.
 29. Circolo A, Welgus HG, Pierce GF, Kramer J, Strunk RC. Differential regulation of the expression of proteinases/anti-proteinases in fibroblasts. Effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1991;266:12283-8.
 30. Salonen J, Uitto VJ, Pan YM, Oda D. Proliferating oral epithelial cells in culture are capable of both extracellular and intracellular degradation of interstitial collagen. *Matrix* 1991;11:43-55.
 31. Berg RA, Schwartz ML, Crystal RG. Regulation of the production of secretory proteins: intracellular degradation of newly synthesized "defective" collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4746-50.
 32. Melcher AH, Chan J. Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: a study of serial sections. *J Ultrastruct Res* 1981;77:1-36.
 33. Everts V, Wolvius E, Saklatvala J, Beertsen W. Interleukin 1 increases the production of collagenase but does not influence the phagocytosis of collagen fibrils. *Matrix* 1990;10:388-93.
 34. Gronowicz G, Hadjimichael J, Richards D, Cerami A, Rossomando EF. Correlation between tumor necrosis factor-(TNF-alpha)-induced cytoskeletal changes and human collagenase gene induction. *J Periodontal Res* 1992;27:562-8.
 35. Sodek J, Ferrier JM. Collagen remodelling in rat periodontal tissues: compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. *Coll Relat Res* 1988;8:11-21.
 36. Werb Z, Hembry RM, Murphy G, Aggeler J. Commitment to expression of the metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. *J Cell Biol* 1986;102:697-702.
 37. Parakkal PF. Involvement of macrophages in collagen resorption. *J Cell Biol* 1969;41:345-54.
 38. Ten Cate AR, Freeman E. Collagen remodelling by fibroblasts in wound repair. Preliminary observations. *Anat Rec* 1974;179:543-6.
 39. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenase from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 1988;23:386-93.
 40. Ingman T, Sorsa T, Suomalainen K, Halinen S, Lindy O, Lauhio A, et al. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. *J Periodontol* 1993;64:82-8.
 41. Kryshtalskyj 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.
 42. Kryshtalskyj E, Sodek J. Nature of collagenolytic enzyme and inhibitor activities in crevicular fluid from healthy and inflamed periodontal tissues of beagle dogs. *J Periodontal Res* 1987;22:264-9.
 43. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res* 2003;82:646-51.
 44. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-52.
 45. Harris ED, Cartwright EC. Mammalian collagenases. In: Barrett AJ editor. *Proteinases in mammalian cells and tissues*. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press; 1997. p. 249-83.
 46. Harris ED Jr, Krane SM. Collagenases (second of three parts). *N Engl J Med* 1974;291:605-9.
 47. van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate contraction of periosteal explants from rabbit calvariae. *Connect Tissue Res* 1995;31:141-51.
 48. van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol* 1997;24:297-305.
 49. 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 gingiva of dogs. *J Dent Res* 2001;80:2080-4.
 50. Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2003;82:687-91.

The expression of MMP-1, -8, and -13 mRNA in the periodontal ligament of rats during tooth movement with cortical punching

Choon Gwack, DDS, MSD,^a Seong-Sik Kim, DDS, MSD, PhD,^{b,e} Soo-Byung Park, DDS, MSD, PhD,^c
Woo-Sung Son, DDS, MSD, PhD,^c Yong-Deok Kim, DDS, MSD, PhD,^d
Eun-Sook Jun, MSD, PhD,^c Mi-Hwa Park^e

Objective: The aim of this study was to determine whether cortical punching stimulates the expression of matrix metalloproteinase-1, -8, and -13 in orthodontic tooth movement in rats. **Methods:** A total of 32 male sprague-dawley rats at 15 weeks old were divided into two groups of 16 rats each, to form the tooth movement with cortical punching (TMC) group and tooth movement only (TM) group. A total of 20 gm of orthodontic force was applied to rat incisors to cause experimental tooth movement. Cortical punching was performed on the palatal side near the central incisor with a 1.0 mm width microscrew in the TMC group. The duration of tooth movement was 1, 4, 7, and 14 days. **Results:** Measurements of the mRNA expression were selected as the means to determine the identification of expression of MMP-1, -8, and -13. In the TMC group, the expression of collagen type I was greater than that of the TM group from day 4 to day 14. Expression of TIMP-1 in the TM group was greater than that of the TMC group in the pressure side of PDL and alveolar bone cell at day 4. In the TMC group, TIMP-1 was expressed at the osteoclast, but not at the tooth surface of the TM group at day 14. Maximum induction of the mRNA of MMP-1 was observed on day 4 in the TMC group, but it was observed on day 7 in the TM group. MMP-8 mRNA of the TMC group was twice greater than that of the TM group at 4 days. In the TMC group, maximum induction of MMP-13 mRNA was observed on day 1. **Conclusions:** These findings suggested that cortical punching can stimulate remodeling of PDL and alveolar bone connective tissues during experimental orthodontic tooth movement in rats. (*Korean J Orthod* 2008;38(3):187-201)

Key words: Matrix metalloproteinase, Collagen type I, Cortical punching

^aPostgraduate student, ^bAssociate Professor, ^cProfessor, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Pusan National University.

^dAssociate Professor, Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University.

^eResearch Scientist, Medical Science Research Institute, Pusan National University Hospital.

Corresponding author: **Seong-Sik Kim.**

Department of Orthodontics, Pusan National University Hospital, 1-10, Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea.

+82 51 240 7443; e-mail, softid@pusan.ac.kr.

Received February 12, 2007; Last Revision March 26, 2008; Accepted March 28, 2008.