

## 기계적 자극이 치주인대 세포의 osteoprotegerin과 receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand mRNA 발현에 미치는 영향

이기주<sup>a</sup> · 이승일<sup>b</sup> · 황충주<sup>c</sup> · 옥승호<sup>d</sup> · 전옥순<sup>e</sup>

본 연구는 치주인대 세포에 지속적이고 점진적 인장력을 가하여 치아 이동 시 형성되는 인장부위의 기계적 자극에 대한 생화학적 전달과 치조골 흡수와 생성 조절 기전을 이해하고자 하였다. 치주인대 세포가 배양된 유연한 성장 표면을 가진 배지에 지속적이고 점진적인 인장력을 가하고 골흡수 인자인 PGE<sub>2</sub>와 골형성 인자인 ALP의 생성량을 1, 3, 6, 12시간 후에 측정하여 정량비교하였고 파골세포 분화기전을 조절하는 OPG, RANKL의 인자들 및 matrix metalloproteinase (MMP)-1, -8, -9, -13, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1의 인자들을 역전사 중합효소 연쇄반응 검사하여 mRNA 발현을 비교한 결과, 치주인대 세포에 인장력을 가한 경우 대조군보다 PGE<sub>2</sub>의 농도가 적었고 ( $p < 0.05$ ) ALP의 농도 변화는 없었으며 OPG의 mRNA 발현이 증가하였으나, RANKL의 mRNA 발현은 감소하였다. 그리고 TIMP-1과 MMP-1, -8, -9, -13의 mRNA 발현이 대조군과 차이가 없었다. 이상의 연구에서 사람의 치주인대 세포는 점진적이고 지속적인 인장력에 대한 반응으로 PGE<sub>2</sub>의 생성과 RANKL의 mRNA 발현은 감소하고 OPG의 mRNA 발현은 증가하여 골흡수를 억제하는 효과를 보이는 것으로 나타났다.

( 주요 단어: 인장력, 치주인대 세포, Osteoprotegerin, Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand )

### 서 론

세포는 다양한 자극에 영향을 받고 반응한다. 전기

적 신호, 자기장, 인장력, 압박력, 압력, 중력 등의 물리적인 형태이거나 전신적 호르몬과 국소적 cytokine 등의 화학적 형태의 다양한 자극에 반응하고 그 결과로 조직의 기능과 항상성이 유지된다.<sup>1</sup> 골조직은 중력의 영향을 받지 않는 우주 공간에서나 오랜 기간 활동 없이 침상에 있는 경우에서 골의 흡수 양상이 증가하고<sup>2,3</sup> 활발한 신체적인 활동과 주기적인 운동은 골의 생성을 활성화시키고 흡수 양상이 억제된다.<sup>4</sup> 골의 흡수와 생성의 균형은 기계적 자극의 적절한 주기와 정도에 의해 조절되는데<sup>5</sup> 특히, 치주인대조직은 항상 저작이라는 기계적 자극에 완충역할을 하며 직접적으로 반응하는 곳이다. 지속적인 교합력의 기계적

<sup>a</sup> 대학원생, <sup>c</sup> 교수, 연세대학교 치과대학 교정학교실.

<sup>b</sup> 교수, <sup>e</sup> 대학원생, 연세대학교 치과대학 구강생물학교실.

<sup>d</sup> 조교수, 전남대학교 치과대학 구강미생물학교실.

교신저자: 황충주

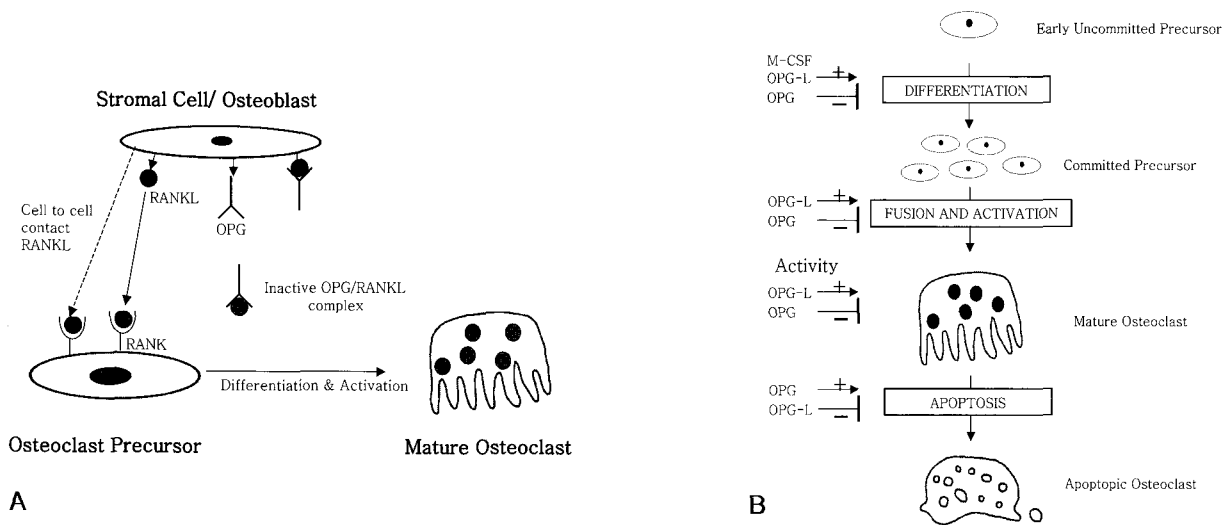
서울특별시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 치과대학 교정학교실 / 02-361-8792

hwang@yumc.yonsei.ac.kr

원고접수일: 2004년 10월 10일 / 원고최종수정일: 2005년 1월

10일 / 원고채택일: 2005년 2월 5일

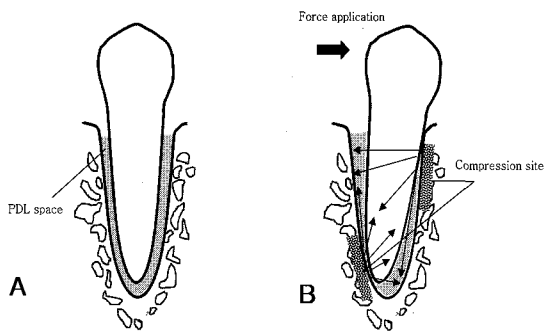


**Fig 1.** Regulation of osteoclastogenesis by the interaction of RANKL and OPG in the bone marrow microenvironment (A). Control of osteoclast function by RANKL and OPG (B). (Reprinted from Hofbauer LC, Heufelder AE. J Mol Med 2001;79:243-53).

자극으로 국소적인 cytokine이 생성되고 치조골의 항상성 유지에도 영향을 준다. 기계적 자극에 대한 세포의 반응은 유전자 조절을 통한 단백질 합성을 변화시키고 이 결과 생성물로 주위의 다른 세포를 조절하면서 전체적으로는 조직의 기능과 항상성을 위한 연쇄반응이 나타난다.<sup>6</sup> 치아 이동은 교정력이라는 기계적 자극에 대한 치주인대와 치조골의 상호 생리적작용에 의해 일어나게 된다.<sup>7</sup> 치주인대가 부분적으로 결손된 유착치와 완전히 없는 임플란트의 경우 교정력을 가하더라도 치아의 이동은 발생하지 않는다. 치주인대가 교정력의 기계적 자극을 생화학적 신호체제로 전환하여 주위 치조골에 전달하는 역할을 하기 때문이다. 그리고 이러한 골조직의 개조 과정에서 치주인대 세포와 골아세포는 collagen 합성과 alkaline phosphatase (ALP) 활성화<sup>8-10</sup>에 의한 골생성 기능과 파골세포 분화와 활성도를 조절하는 osteoprotegerin (OPG)과 receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)를 생성하여 결과적으로 골흡수 기능도 조절하는 것으로 밝혀졌다.<sup>11,12</sup> RANKL은 파골세포의 RANK (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B)와 결합하여 분화과정을 촉진하고 파골세포를 활성화하며 파골세포의 apoptosis를 억제하여 골흡수과정을 촉진한다. OPG는 RANK와 경쟁적 결합관계로서 RANKL과 결합하여 복합체를 만들고 RANKL을 비활성화 시키면서 골흡수과정을 억제한다 (Fig

1). 그리고 OPG와 RANKL의 조절인자들 중에서 interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), transforming growth factor (TNF), para-thyroid hormone (PTH), 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), glucocorticoid 등은 RANKL의 생성을 증진시켜 골흡수 기능을 촉진시킨다.<sup>11</sup> 결국 치주인대세포는 교정력을 가했을 때 기계적 자극의 신호를 전환하는 역할과 치조골 흡수와 생성을 조절하는 역할을 수행한다.

교정력에 의해 치아가 이동할 때 기계적 자극에 있어서 압박부위와 인장부위의 물리적 차이가 있게 된다. 압박부위는 치주인대와 치아의 직접적인 접촉에 의해 늘리는 압박력 효과가 있으며 인장부위는 치조골과 치아사이의 거리가 멀어짐으로 생기는 인장력 효과가 있을 수 있다. 치주인대가 압박되는 부위에서는 파골세포 기전을 활성화시키는 생화학적 신호로 전환되어 IL- $1\beta$ , PGE<sub>2</sub>가 증가하고, 이어서 OPG와 RANKL을 조절하여 결과적으로 골흡수를 유도한다. IL- $1\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>는 골흡수가 발생하는 압박부위에서 주로 생성되지만 인장부위에서도 함께 증가한다.<sup>13-15</sup> 이러한 생화학적 인자들은 치주인대 공간을 통해서 주위 치조골에 영향을 주게 되며 인장부위에도 파골세포 분화 기전의 신호로 전달되어 골흡수 기전이 유도될 수 있다 (Fig 2). 그러나 실제 치아이동 시 압박부위에서는 골의 흡수가, 인장부위에서 골의 생성이 주



**Fig 2.** Biomechanical signals are transformed into biological responses within the PDL space (A). As the tooth moves, regulation factors of osteoclastogenesis in the compression site are expressed into the PDL space and gingival sulcus (B).

로 일어나게 된다. 이는 물리적 자극의 주기와 정도의 차이가 흡수와 생성의 골대사를 조절하여 압박과 인장의 물리적인 자극의 차이에 의해 연속적인 생화학적 반응 체계가 결정되기 때문이다.<sup>8</sup>

이 연구는 치주인대 세포에 지속적이고 점진적인 인장력을 가하여 치아 이동 시 형성되는 인장부위의 기계적 자극에 대한 생화학적 전달과 치주골 흡수와 생성 조절 기전을 이해하고자 하였다. 치주인대 세포가 배양된 유연한 성장표면을 가진 배지에 지속적이고 점진적인 인장력을 가하고 골흡수 인자인 PGE<sub>2</sub>와 골형성 인자인 ALP의 생성량을 1, 3, 6, 12시간 후에 측정하여 정량비교 하였다. 그리고 파골세포 분화기전을 조절하는 OPG, RANKL의 인자들과 collagen을 분해 조절하고 파골세포가 골표면에 부착되도록 osteoid 층을 제거하는데 관여하는 matrix metalloproteinase (MMP)-1, -8, -9, -13, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1의 인자들을 역전사 중합효소 연쇄반응 검사하여 mRNA 발현을 비교하였다.

**실험재료 및 방법**

**세포배양**

교정치료를 받고자 내원한 20대 남자에서 완전히 맹출되고 치근 표면에 병소가 없는 상하악 제1소구치를 발치하여 치근 중앙 1/3부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 조직 배양 용기에 배양시킨 치주인대 세

포를 10% fetal bovine serum (FBS) 및 100 U/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin이 포함된 α-minimal essential medium (α-MEM) 10 ml에 세포를 고르게 분주 시켰다. 그리고 37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 흡입 배양기에서 2일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 세포가 80-90% 정도 충분히 증식할 때까지 배양하였다. 세포의 계대배양을 위하여 최소량의 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA) 용액을 첨가하고, CO<sub>2</sub> incubator에 3분간 방치하여 세포가 탈착되도록 하였다. 세포가 탈착된 후 배지를 첨가하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 원심분리하고 다시 적당량의 배지를 첨가하여 새로운 배양기에 계대배양하였다. 본 실험에서는 6-8세대의 세포를 사용하였다.

**기계적 자극**

**주형의 제작**

기계적 자극은 유연한 배양 용기의 바닥면적을 변화시켜서 배지에 고정된 배양세포가 간접적으로 자극을 받도록 하였다. 유연한 성장표면을 가진 배지의 영구변형이 없는 20%의 circumferential strain을 가하기 위해서 높이는 7.6 mm, 바닥의 반지름 17 mm의 볼록하게 생긴 모양의 주형을 설계하였다. 주형은 0.01 mm오차 범위에서 황동으로 제작되었고, 주형을 위치시키는 판에 6-well의 Petriperm dish (BioFlex<sup>®</sup>, Hillsborough, USA) plate를 고정시켜 인장된 상태를 유지시켰다 (Fig 3).

**기계적 자극의 조절**

세포에 가해지는 기계적 자극의 정도는 배양 용기의 바닥면적 변화량과 이때 가해지는 힘에 비례한다. 유연한 성장표면을 가진 Petriperm dish를 주형위에 올려놓고 눌러서 20%까지 점진적으로 증가되도록 하였다. 배지를 누르는 힘을 조절하기 위해서 배지 위에 수조를 놓고 수조에 물이 유입되도록 하였다. 이때 유입된 물의 양이 증가하면서 가중되는 무게에 의해 주형 위에 놓인 배지가 눌리도록 하여 성장표면이 점진적이고 지속적인 형태의 인장력을 받도록 하였다 (Fig 4). 유연한 성장표면에 단위시간당 가해지는 힘은 배지를 위에서 누르는 아래쪽 수조에 유입되는 단위시간당 물의 무게에 의해서 결정된다. 이 실험에서 효과적인 기계적 자극의 크기를 결정하기 위해 배지에 가해지는 물의 무게 증가량을 달리 적용하여 그에 따른 치주인대 세포로

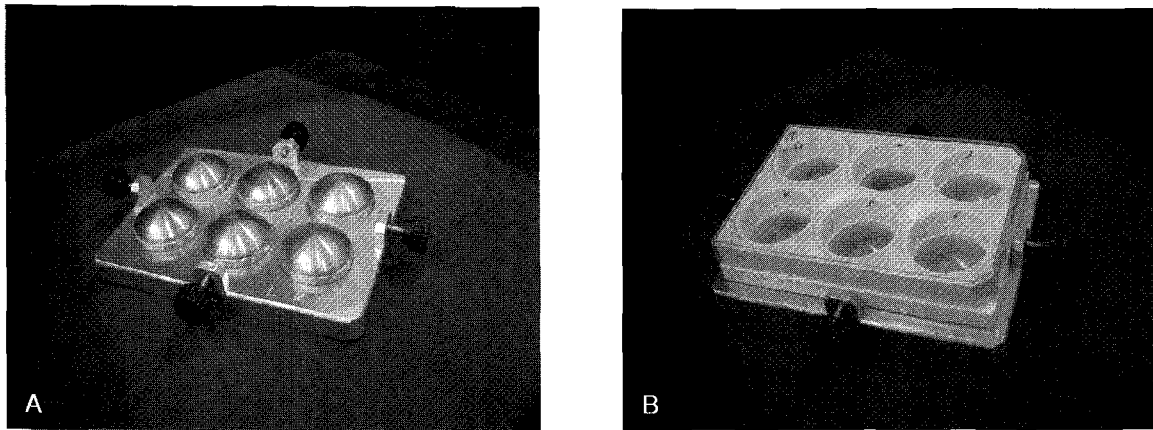


Fig 3. Base with 6-spheroidal convex templates (A) and template base assembled with a 6-well Petriperm dish (B).

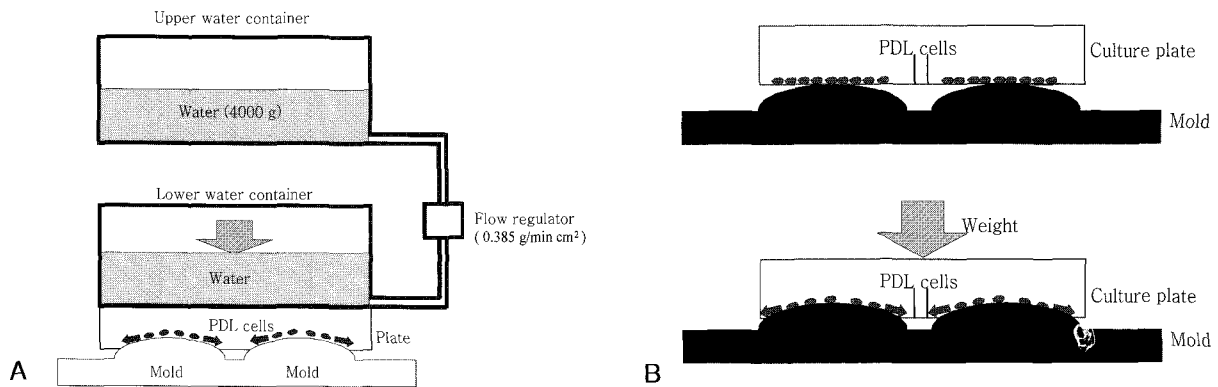


Fig 4. Method used to apply tensile force. Precultured PDL cells are continuously stretched by using a gradually weighted water container. A flow regulator controls the velocity of water flow from the upper water container to the lower one (A); The resulted biaxial tension in the flexible membrane creates a state of uniform biaxial strain in PDL cells (B).

부터 유리된 PGE<sub>2</sub> 농도 차이를 비교하였다. 성장표면의 circumferential strain이 20%가 되기 위해서 4000 g의 무게가 필요하기 때문에 위쪽 수조에 4000 g의 물을 담고 배지 위에 놓인 아래쪽 수조에 물의 유입 속도를 달리하여 각각 3 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr 동안 모두 흘러 내려가게 하였다. 이때 가해지는 단위 시간당 무게와 단위 면적당 가해지는 무게를 각각 계산하였다 (Table 1). 인장력을 적용하고 6시간 경과한 후에 PGE<sub>2</sub> 농도 차이를 검사한 결과 점진적인 인장력에 의해서 PGE<sub>2</sub> 농도가 감소하였고, 일시에 누르고 인장상태를 유지시킨 경우에서 7.6 pg/ml로 약간

증가한 결과를 보였다. 분당 0.385 g/cm<sup>2</sup>의 무게가 배지에 가해지는 경우에 PGE<sub>2</sub>가 -97.3 pg/ml로 최대한 감소하였기 때문에 적절한 인장력 자극의 크기로 판단하였다.

#### 기계적 자극의 적용

실험군은 Collagen I으로 처리된 친수성의 유연한 성장표면을 가진 Petriperm dish에 치주인대 세포를 ( $1 \times 10^5$  cells/well) 넣고 48시간 배양한 후 주형을 위치시키고 3시간 동안 점진적으로 단위면적을 증가

**Table 1.** Difference of PGE<sub>2</sub> synthesis between the control and test group according to different water container

Emptying time of water container	3hr	6hr	12hr	24hr
g/min	22.2	11.1	5.6	0.4
g/min cm <sup>2</sup>	0.385	0.192	0.096	0.048
Δ PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	-97.3	-34.0	-7.8	-30.0

The test for optimal range of tensile effect was carried out by using a water container gradually weighted. The applied water weight per minute and surface area according to different water container emptying times. The negative values of Δ PGE<sub>2</sub> shows that PGE<sub>2</sub> synthesis of PDL cells is reduced by tensile force.

시킴으로써 인장력의 효과를 주었다. 1, 3, 6, 12의 시간 간격으로 정량분석을 위해 세포 상층액을 채취하였고 RT-PCR 분석을 위해서 배양 치주인대 세포로부터 mRNA를 분리하였다. 대조군은 인장력 효과를 제외하고 실험군과 동일한 조건으로 세포배양하고 분석하였다.

**분석**

**PGE<sub>2</sub> 농도 측정**

PGE<sub>2</sub> enzymeimmunoassay (EIA) system (BIOT RAK, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 치주인대 세포의 PGE<sub>2</sub> 생성능을 평가하였다. Goat anti-mouse polyclonal antibody로 표면처리된 microplate에 PGE<sub>2</sub> 표준용액과 세포상층액을 각각 50 μl씩 넣고 mouse anti-PGE<sub>2</sub> antibody 용액과 PGE<sub>2</sub>-peroxidal conjugate 용액을 50 μl씩 각각의 well에 넣고 1시간 반응시킨 다음 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 그리고 enzyme substrate를 각각의 well에 150 μl씩 넣고 실온에서 30분 반응시켰다. 반응정지 용액인 sulphuric acid를 100 μl씩 넣은 후에 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 샘플의 흡광도 값은 표준용액의 흡광도와 비교한 농도(pg/ml)로 전환하였다.

**ALP 농도 측정**

ALP의 정량 분석은 SIGMA ALP reagent (SIGMA<sup>®</sup>, St. Louis, USA)를 사용하였다. 30℃를 유지한 ALP reagent 1 ml에 세포상층액 20 μl를 첨가한 후에 30초간 충분히 혼돈다. 405 nm에서 바로 흡광도를 측정하고 1분 및 2분 후의 흡광도를 각각 측정한 후 분당 평균 흡광도 변화량을 이용하여 샘플의 ALP

(U/L)를 환산하였다.

**역전사 증합효소 연쇄반응검사**

총 mRNA 분리를 위해 세포배양액을 완전히 제거한 후 세포를 Trizol reagent로 처리한 다음 CHCl<sub>3</sub>를 넣고 충분히 교반하고 4℃에서 20분간 12000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 취한 다음 isopropyl alcohol을 넣고 4℃에서 15분간 12000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 버렸다. 75% ethanol로 세척한 후 20분간 건조시키고 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 포함한 2차 증류수로 용해시켰다. 그리고 cDNA 합성을 위해서 mRNA 1.0 μg에 해당하는 mRNA 용액을 취하고 2차 증류수에 넣어 12.5 μl를 만든 후에 1 μl random hexamer primer (hexa-nucleotide mix: Germany) 와 1 μl oligo (dT)<sub>18</sub> primer를 혼합하여 70℃에서 5분 반응시키고 4.0 μl reaction buffer, 0.5 μl Recombinant RNase inhibitor, 1.0 μl dNTP mix, 1.0 μl MMLV reverse transcriptase를 혼합하여 42℃에서 1시간 반응시킨 다음 100℃에서 5분간 두어 반응을 정지시키고 DEPC-treated water를 첨가하여 -20℃에서 보관하였다. 증합효소 연쇄반응을 위해서 합성된 cDNA 5 μl에 5' 시발체와 3' 시발체를 20 pmol 씩 혼합하고, 5 μl의 PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3)와 각각의 0.2 mM씩의 dATP, dTTP, dGTP, dCTP를 혼합하였다. 여기에 2.5단위의 Taq DNA polymerase를 혼합하여 총반응액을 50 μl로 만든 후 Gene Cycler에서 94℃ 30초, 55℃ 60초, 72℃ 30초로 증합효소 연쇄반응의 산물의 증거가 없어지기 직전의 주기를 결정하고 72℃에서 5분간 반응시켰다. β-actin, OPG, RANKL, MMP-1, -8, -9, -13 및 TIMP-1을 각각 35 주기로 반응시켜 대수적 증폭기

Table 2. Primers for RT-PCR

Specificity	Oligonucleotide sequence
$\beta$ -actin	sense 5'-ACACCACTGTGTTGGCGTACAGGTCTTTGC- 3' anti-sense 5'-ATGAGGATCCTCACCGAGCGGCTACAGC- 3'
OPG	sense 5'-AGAATGCCTCCTCACACAGG- 3' anti-sense 5'-TCAAGCAGGAGTGCAATCG- 3'
RANKL	sense 5'-GGGTATGAGAACTTGGGATT- 3' anti-sense 5'-AGCAGAGAAAGCGATGGT- 3'
MMP-1	sense 5'-AAGGTTAGCTTACTGTACACGCTT- 3' anti-sense 5'-CGACTCTAGAAACACAAGAGCAAGA- 3'
MMP-8	sense 5'-TGGAGAATTGTCACCGTGATCTCTT- 3' anti-sense 5'-CCAAGTGGGAACGCACTAACTTGA- 3'
MMP-9	sense 5'-GACGCGCCTGTGTACACCCACA- 3' anti-sense 5'-GCGGAGATTGGGAACCGAGCTGTA- 3'
MMP-13	sense 5'-TGGGATAACCTTCCAGAATGTCATAA- 3' anti-sense 5'-ATGATCTTTAAAGACAGATTCTTCTGG- 3'
TIMP-1	sense 5'-TGCTGGGTGGTAACTCTTTATTTCA- 3' anti-sense 5'-ATCCTGTTGTTGCTGTGGCTGATAG- 3'

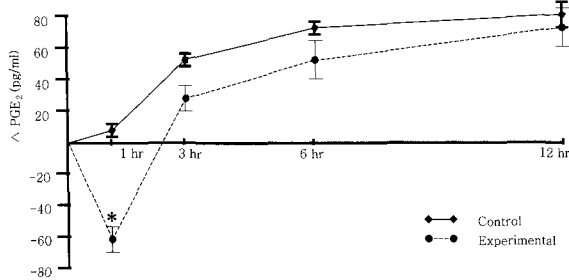


Fig 5. Effects of tensile force on PGE<sub>2</sub> synthesis of PDL cells. \*  $p < 0.05$  versus controls. Data are expressed as Mean  $\pm$  SE.

간 동안의 중합효소 연쇄반응산물을 모으고 1.5% agarose gel에서 전기영동을 하였다. Gel은 ethidium bromide로 염색하고, 밀도측정기와 영상분석기를 이용하여 정량분석 하였다.

연구결과

인장력에 의한 치주인대세포의 PGE<sub>2</sub>의 생성

PGE<sub>2</sub>의 각 시간대별 생성변화를 처음 0시간과의 변화량인  $\Delta$ PGE<sub>2</sub>로 측정하였다. 대조군에서  $\Delta$ PGE<sub>2</sub>는 1시간 후 8  $\pm$  6.2 pg/ml, 3시간 후 57  $\pm$  6.7 pg/ml, 6시간 후 75  $\pm$  5.2 pg/ml, 12시간 후 71  $\pm$  13.0 pg/ml

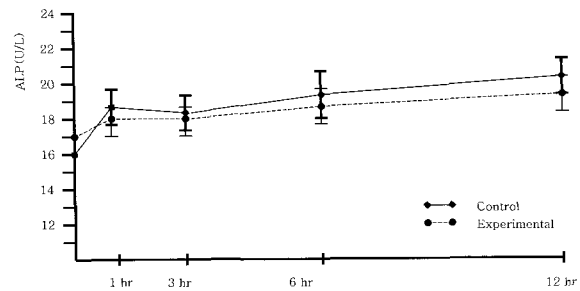
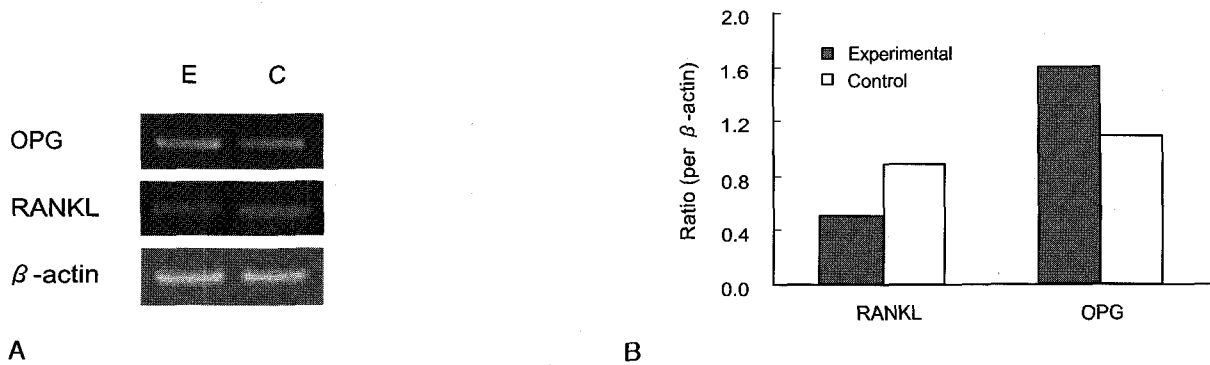


Fig 6. Effects of tensile force on ALP synthesis of PDL cells. Data are expressed as Mean  $\pm$  SE.

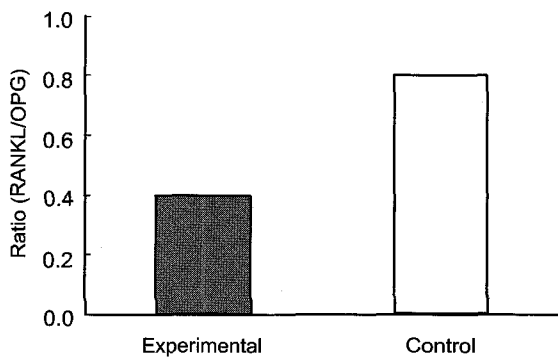
으로 증가하였다. 지속적인 인장력(0.385 g/min cm<sup>2</sup>)을 3시간 동안 가한 실험군에서  $\Delta$ PGE<sub>2</sub>는 1시간 후 -48  $\pm$  10.2 pg/ml로 PGE<sub>2</sub> 농도가 최저값을 보이며 대조군보다 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 그리고 3, 6, 12시간 후  $\Delta$ PGE<sub>2</sub> 농도가 각각 29  $\pm$  11.5 pg/ml, 52  $\pm$  14.7 pg/ml, 68  $\pm$  12.2 pg/ml로 점차 증가하였다 (Fig 5).

인장력에 대한 치주인대 세포의 골형성 표식 인자인 ALP의 생성

대조군에서 ALP는 처음 농도 15.9  $\pm$  1.2 U/L에서 1시간 후 18.7  $\pm$  1.0 U/L, 3시간 후 18.2  $\pm$  1.1 U/L, 6시간 후 19.3  $\pm$  1.4 U/L으로 증가하여, 12시간 후 20.3



**Fig 7.** Expression of RANKL and OPG mRNA (A). Densitometric analysis of RT-PCR product for RANKL and OPG (B). Tensile stress was applied to the cells for 12 hours. E, tensile stress; C, control.



**Fig 8.** Densitometric analysis of relative RT-PCR product ratios for RANKL and OPG. Tensile stress was applied to the cells for 12 hours.

$\pm 1.2$  U/L이 되었다. 실험군에서 처음 농도  $17.0 \pm 0.7$  U/L에서 1시간 후  $18.0 \pm 0.9$  U/L, 3시간 후  $17.7 \pm 0.8$  U/L, 6시간 후  $18.4 \pm 1.1$  U/L으로 증가하여, 12시간 후  $18.9 \pm 1.1$  U/L이 되었다 (Fig 6).

#### OPG와 RANKL 발현의 변화

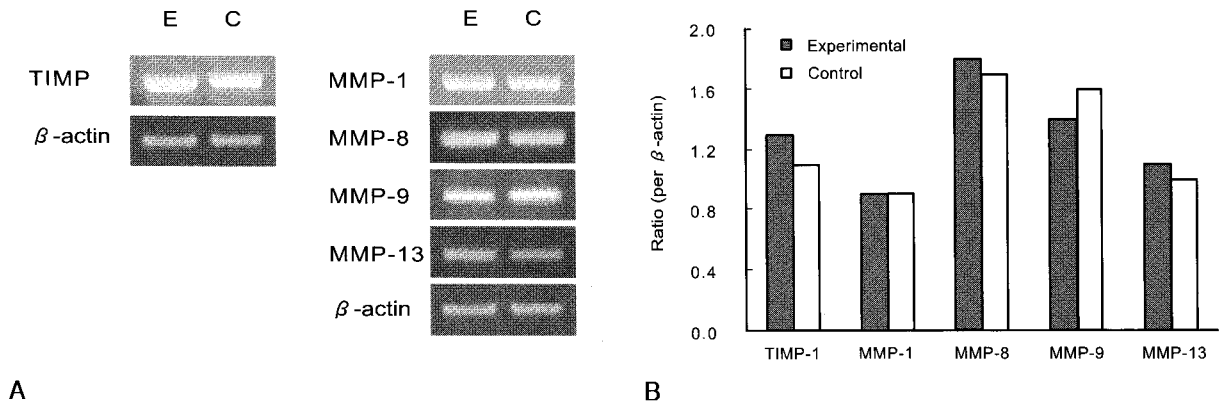
Densitometric 분석에서 OPG/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 1.6이고 대조군에서는 1.1로 실험군이 높게 나타났다. RANKL/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 0.5이고 대조군에서는 0.9로 실험군이 작게 나타났다 (Fig 7). RANKL과 OPG의 비율은 실험군에서 0.4이고 대조군에서는 0.8로 실험군이 낮게 나타났다 (Fig 8).

#### MMP-1, -8, -9, -13 및 TIMP-1의 발현

TIMP-1/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 1.3이고 대조군에서 1.1로 나타났다. MMP-1/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 0.9이고 대조군에서는 0.9이고 MMP-8/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 1.8이고 대조군에서는 1.7이고 MMP-9/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 1.4이고 대조군에서는 1.6이고 MMP-13/ $\beta$ -actin 비율은 실험군에서 1.1이고 대조군에서는 1.0이다 (Fig 9).

#### 총괄 및 고안

세포는 다양한 자극에 반응하고 그 결과로 조직의 기능과 항상성이 유지된다. 세포는 기계적 자극을 생물학적 신호로 전환시키는 생명체의 기본 단위이다. 그리고 물리적 자극을 받은 세포들은 조직의 기능에 따라 항상성을 유지하려는 반응을 한다. 피부의 섬유아세포는 복부 비만 등으로 조직이 팽창하는 경우 collagen과 elastin의 합성이 증가되고<sup>16</sup> 혈관 벽을 이루는 내피 세포에서는 고혈압 질환으로 혈압이 증가하면 collagen 합성이 증가하여<sup>17</sup> 조직의 항상성을 유지한다. 치아 이동 시 치은 조직이 압박되어 밀리는 부위에서는 섬유아세포의 collagen과 elastin의 합성이 증가되고 collagen 분해효소는 감소된다. 이러한 압박 부위 치은조직의 항상성 유지는 치아 이동을 방해하면서 치료 후 재발에 영향을 준다.<sup>18</sup> 골조직은 기계적 자극의 적절한 주기와 정도에 의해 흡수와 생성의 균형이 조절되고 항상성이 유지된다. 골조직의 흡수와 생성의 균형에서는 적절한 수준 이하의 자극은 atrophy, 이상의 자극은 hypertrophy의 반응을 보인다.



**Fig 9.** Expression of TIMP-1, MMP-1, MMP-8, MMP-9, and MMP-13 mRNA (A). Densitometric analysis of RT-PCR product for TIMP-1, MMP-1, MMP-8, MMP-9, and MMP-13 (B). Tensile stress was applied to the cells for 12 hours. E, tensile stress; C, control.

다. 그리고 자극의 주기와 정도가 더 커지면 fatigue failure와 spontaneous fracture의 다른 형태의 반응을 보일 수 있다.<sup>8</sup> 기계적 자극에 대한 세포의 반응은 주위의 다른 세포를 조절하면서 결과적으로 조직의 항상성 유지와 기능 수행으로 나타난다.<sup>6</sup> 치아 이동은 치주인대조직이 교정력이라는 물리적 자극을 치아주위의 세포와 조직에 생화학적 신호로 전환시키고 치조골의 흡수와 생성을 조절하기 때문에 일어난다.<sup>8</sup> 치조골은 우리 인체의 골조직 중에서 교합력에 견디며 기계적 자극을 항상 받는 부위이다. 이러한 치주조직은 피동적인 역할을 하지만 그 자체는 지속적인 흡수와 생성을 하는 능동적인 조직이기 때문에 세포와 기질과 다양한 여러 종류의 세포들로 구성되어 있다. 그 중 치주인대 세포와 골아세포는 골의 흡수와 생성을 조절하고 치조골 개조의 중요한 역할을 한다.<sup>12</sup> 이러한 세포에 영향을 줄 수 있는 자극들은 PTH, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcitonin, estrogen, glucocorticoid 등의 전신적인 호르몬과 IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, TNF, transforming growth factor (TGF), bone morphogenetic protein (BMP) 및 insulin-like growth factor (IGF) 의 국소적인 cytokine 뿐 아니라 운동의 기계적 자극, 중력, 자기장, 인위적 외력 등 다양한 형태로 알려져 있다.<sup>19-24</sup> 치주인대는 백악질과 치조골 사이의 결합조직으로 구성되며, 치조와에서 치아를 지지해주고 치아에 가해지는 힘에 일차적으로 반응하는 완충 역할을 한다. 저작이나 교합 접촉 시 또는 교정치료의 자극이

치아에 작용하면 일차적으로 치주인대 세포와 세포 외액과 기질의 변화가 일어나며 혈관의 압박으로 인해 치조골의 Volkmann's canals를 통해 골수로의 혈류의 변화가 발생하게 된다.<sup>24-26</sup> 치주인대조직의 반응으로 염증세포의 출현과 함께 염증세포, 섬유아세포, 골아세포에서 분비되는 국소적인 생화학물질인 cytokine이 생성된다. 이러한 cytokine은 치주인대 자체의 유지나 개조에 국한되지 않고 인접 치조골의 골아세포와 파골세포의 생성과 분화에 영향을 주어 치주인대 세포가 골의 흡수와 생성을 조절하도록 한다.<sup>24</sup> 이러한 이유 때문에 치주인대가 부분적으로 결손된 유착치와 완전히 없는 인공매식 치아의 경우 교정력을 가하더라도 치조골개조에 의한 치아이동은 발생하지 않는다. 치주인대 세포는 교정력의 기계적 자극을 생물학적 신호로 전환하여 즉각적인 cytokine 유전자의 발현과 생성을 조절한다. 그리고 주위 세포를 조절하거나 연쇄적으로 다른 cytokine을 생성하여 결과적으로 치조골 개조 반응의 signal network를 형성한다. Roberts 등<sup>8</sup>과 Calvalho 등<sup>6</sup>은 골조직에서의 기계적 자극에 대한 유전자 조절기전의 분자생물학적 영향을 강조하였고 Pavlin 등<sup>10</sup>은 치주인대에 있어서 기계적 자극은 치조골의 항상성 유지에 중요한 조절 인자이며 치아 이동에 본질적인 역할을 하고 치주인대 세포의 분자생물학적 이해는 교정치료와 치주조직의 재생과 치유, 임플란트, 수술후 창상치유의 증진에 중요하다고 강조하였다. 그래서 이러한 기전을



이해하기 위해서 많은 세포에 기계적 자극을 가하는 분자생물학 실험이 시행되고 있다.

### 기계적 자극

기계적 자극에 대한 세포실험에서 자극을 주는 방법과 크기의 결정은 매우 중요하며 지금까지도 생체의 조건을 재현하기 위해 많은 시도를 하고 있다. 초기 연구에서는 교정용 확장 스크류가 연결 부착된 두 조각의 아크릴 바닥에 세포 배양용기를 접착하고 확장하여 인장력을 가하였다.<sup>27</sup> Yeh와 Rodan<sup>28</sup>은 collagen ribbon에 세포를 배양하고 반복적인 신장을 가하였고 Banes 등<sup>29</sup>의 연구에서는 압력을 조절하여 주기적인 인장력을 가하였지만 배양용기의 최대 변형의 한계가 있었다. Hasegawa 등<sup>30</sup>은 유연한 성장표면의 배양용기에 주형을 위치시키고 그 위에 납으로 된 추를 올려서 배지가 신장이 되도록 하였고 Sandy 등<sup>31</sup>은 불록한 시계유리 위에 유연한 바닥을 가진 배양용기를 올려놓고 자극의 빈도와 정도를 지렛대의 추를 이용하여 조절하였다. Winston 등<sup>32</sup>은 10%까지의 변형이 가능한 biaxial strain으로 주기적인 인장력을 가하는 장치를 이용하였다. Ngan 등<sup>33</sup>과 Shimizu 등<sup>34</sup>은 배양용기의 표면적을 5-18%까지 증가시키면서 주기적인 신장과 이완의 기계적 자극을 가하였다. 대부분의 연구가 기계적 자극의 방법으로 유연한 성장표면을 가진 배양 용기 표면적을 늘릴 수 있도록 불록한 주형 위에 위치시킨 후 일시에 눌러서 인장된 형태를 유지시키는 방법<sup>33,35,36</sup>과 배지의 성장표면 밑 부분에 압력을 주기적으로 변화시켜서 성장표면의 이완과 신장을 반복하게 하여 주기적인 인장력을 가하는 방법<sup>34,37,38</sup>을 사용하였다. 그 결과 주기적이고 크기가 큰 인장 자극에 의해 파골세포 형성을 유도할 수 있는 IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>의 생성이 증가하였다. 이러한 결과는 기계적 자극에 대한 세포의 반응은 있었지만 치아 이동 시 치조골의 생성이 주로 일어나는 인장부위의 인장력 효과를 충분히 설명할 수 없었다. 골개조에 있어서 골의 첨가는 생성이 증가하거나 흡수가 억제되어야 하기 때문이다. 그래서 치아이동 시 치주인대 세포가 받는 유사한 조건을 재현할 수 있는 실험방법의 새로운 시도가 필요하게 되었다. 최근에는 압박부위의 효과를 밀폐된 배양 용기에 직접 공기압력을 가하거나<sup>39</sup> 배양 세포위에 유리 실린더를 놓아 직접 눌러도록 하는 방법<sup>12</sup>이 시도되고 있다. 인장력의 효과에 있어서는 비교적 작은 크기의 인장력을 이용하여

골생성 효과를 연구하고 있지만<sup>40</sup> 충분한 인장력의 효과를 재현하기 위해서는 방법상의 보완이 필요하였다. 그래서 본 실험에서는 지속적인 인장력을 치주인대 세포에 가할 수 있는 기계적 자극을 고안하였고 효과적인 기계적 자극의 세기를 결정하기 위해서는 배지에 인장력 크기를 다르게 가하여 실험군과 대조군간의 PGE<sub>2</sub> 농도 변화를 측정하였다 (Table 1). 인장력의 세기는 배지에 가해지는 물의 무게 증가량을 달리 적용하였고 그 결과 일시에 누른 경우에서 PGE<sub>2</sub>의 농도가 7.6 pg/ml로 증가한 결과를 보였고 일시에 누르고 유지시킨 최와 노의 인장력 실험 결과와 유사하였다.<sup>23</sup> 그러나 지속적인 인장력을 가한 경우에서 PGE<sub>2</sub> 농도가 감소하는 결과를 보였다. 그리고 단위 면적당 가해지는 힘이 약해져서 인장력의 세기가 작아질수록 실험군과 대조군과의 차이는 점점 적어졌다. 그래서 4000 g의 물을 3시간 동안 흘러내려서 배양용기의 유연한 성장표면을 0.385 g/min cm<sup>2</sup>로 눌러서 발생하는 지속적인 인장력을 치주인대 세포에 가하는 기계적 자극으로 결정하였다.

### PGE<sub>2</sub>와 ALP

PGE<sub>2</sub>는 IL-1 $\beta$ 와 함께 파골세포 형성을 유도하는 대표적인 물질로 잘 알려져 있다. 치주질환에서는 염증부위에서 생성되고 치아 이동시에는 압박부위에서 주로 생성되면서 파골세포를 활성화시키고 치조골 흡수를 유도한다. Davidovitch 등<sup>19</sup>의 고양이의 조직표본 연구에서는 치아 이동 시 인장부위와 압박부위에서 면역 조직 화학 염색의 결과 PGE<sub>2</sub>가 인장부위보다 압박부위에서 더 강하게 검출되었지만 양측에서 1시간 이후 증가하였다. Iwasaki 등<sup>41</sup>은 치아 이동 시 치은 열구액의 IL-1 $\beta$ 와 IL-1 receptor antagonist는 치아의 이동속도와 관계가 있는 것으로 보고하였다. Waddington과 Embery<sup>42</sup>는 치아 이동 시 치은열구액을 통한 IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub> 등의 증가와 기계적 자극에 반응된 염증세포와 활성화된 골아세포를 관찰하였다. 그래서 PGE<sub>2</sub>와 IL-1 $\beta$ 는 세포실험과 치주조직 표본 연구에서 기계적 자극에 의해 생성되고 세포반응의 조절인자로 여겨지고 있다. 그런데 PGE<sub>2</sub>는 기계적 자극의 차이에 다르게 반응한다. 압력이 조절되는 기실을 이용하여 사람의 치주인대 세포와 MC3T3-E1세포에 간헐적인 양수압과 음수압을 가한 실험<sup>39,43</sup>에서는 양압의 적용 시 PGE<sub>2</sub>의 합성이 증가하였고 음압의 경우 감소하여 각기 다른 양상을 보였다. 그리고 치주

인대 세포에 직접 압박력을 가한 실험<sup>12</sup>에서 PGE<sub>2</sub>의 mRNA 발현이 증가하였고 점진적 인장력을 가한 이 실험에서는 PGE<sub>2</sub>의 생성이 감소하였다. 이러한 실험 결과들을 고려할 때 인장력과 압박력의 물리적 자극의 차이가 치주인대 세포의 PGE<sub>2</sub>의 생성에 영향을 주는 것으로 생각된다. 그리고 PGE<sub>2</sub>의 생성은 자극의 크기에 영향을 받는다. Yamaguchi 등<sup>38</sup>의 연구에서 9-24%의 다양한 크기의 주기적인 인장력을 치주인대 세포에 가한 경우 자극의 크기에 PGE<sub>2</sub> 생성량이 비례하였다. 일시에 과도한 인장력을 가하거나 주기적인 인장력을 가하여 PGE<sub>2</sub>의 생성이 증가하였지만 점진적이고 지속적 인장력을 가한 이 실험에서는 생성이 감소하였다. 이것은 기계적 자극의 주기와 정도의 차이가 PGE<sub>2</sub>의 생성을 조절하여 골흡수 기전에 영향을 주는 것을 의미한다. 골형성에서도 작은 크기의 인장력을 가한 경우에는 염증성 cytokine인 IL-1β의 생성이 억제되고,<sup>40,44</sup> ALP 활성화<sup>10</sup>와 collagen 합성<sup>45,46</sup>이 증가하였다. Pavlin 등<sup>10</sup>은 쥐의 치주인대세포를 이용한 실험에서 기계적 자극에 의해 골형성 인자인 ALP의 초기 증가와 collagen gene 발현이 증가하여 골형성유도 기전에 관여하는 것을 발표하였다. 그러나 이 실험에서는 골형성 효과의 지표인 ALP의 12시간 이내의 변화는 없었다. 이것은 Pavlin 등<sup>10</sup>의 연구결과 기계적 자극을 가하고 48시간 이후에서 증가된 점을 고려할 때 인장력에 의해 ALP 활성화는 반응 초기에 일어나지 않는 것으로 생각된다.

OPG와 RANKL, TIMP-1, MMP-1, -8, -9, -13

골아세포와 치주인대 세포에서 분비되는 OPG와 RANKL의 coupling factor는 파골세포 분화기전과 활성화를 조절한다. 이들 세포들은 파골세포의 분화 과정에 영향을 주는 세 가지 요소인 RANKL, M-CSF, OPG를 생성한다.<sup>11</sup> M-CSF는 파골세포의 분화 과정의 시작을 유도한다. RANKL은 파골세포의 RANK (receptor activator of nuclear factor κB, osteoclast differentiation and activation receptor: ODAR)와 결합하여 분화과정을 촉진하고 파골 세포를 활성화하며 파골세포의 apoptosis를 억제하여 골흡수 과정을 촉진한다. OPG는 RANK와 경쟁적 관계로서 RANKL과 결합하여 복합체를 만들고 RANKL을 비활성화 시키면서 골흡수 과정을 억제한다 (Fig 1). OPG와 RANKL의 비율(RANKL/OPG)은 골대사의 지표로 이용되고 있으며 osteoporosis의 경우는 낮게

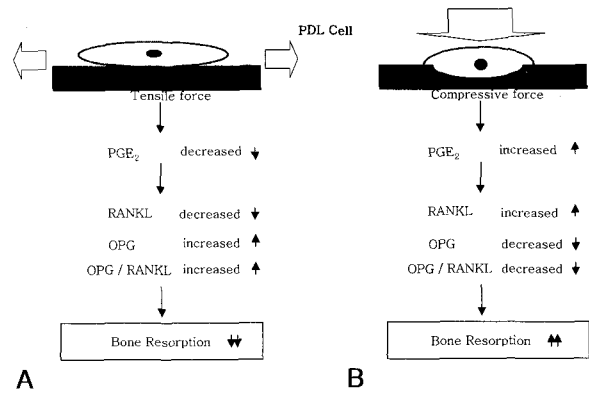


Fig 10. The response of PDL cells according to the type of mechanical strain. Tensile effect (A) and compressive effect (B).

osteoporosis는 높게 나타난다.<sup>47</sup> 최근 Rubin 등<sup>48</sup>의 murine stromal cell에 비교적 적은 크기의 기계적 자극(2% 10 cycles/min)을 가한 실험에서 총 세포수, thymidine uptake와 ALP 활성도에서는 효과가 없었지만 ODF (osteoclast differentiation factor) mRNA의 발현이 감소하여 osteoclastogenesis가 억제되고 파골세포의 수가 감소하였다. 점진적인 인장력을 가한 이 실험에서도 RANKL의 mRNA 발현이 감소하고 OPG의 mRNA 발현이 증가하여 파골세포 분화기전의 지표인 RANKL/OPG가 감소하였다. 결과적으로 인장력으로 파골세포 분화 기전이 억제되는 효과가 나타났다. 그러나 Kanzaki 등<sup>12</sup>의 실험에서는 치주인대 세포가 압박력의 기계적 자극을 받고 PGE<sub>2</sub>의 생성이 증가되고 RANKL mRNA 발현이 증가하여 압박부위의 파골세포 분화 기전이 촉진되는 결과를 보였다. 이러한 기계적 자극의 차이가 RANKL, OPG의 발현에 영향을 주는 것으로 생각된다. 그리고 TIMP-1, MMP-1, -8, -9, -13은 collagen 분해조절 기전에 관여하고 파골세포 분화기전에 직접적인 영향을 주지는 않지만 파골세포가 골표면에 부착하도록 osteoid 층을 제거하여 간접적으로 영향을 주기 때문에 RANKL, OPG와 비교하였다. 본 실험에서는 이들 인자의 mRNA 발현은 특이할만한 변화가 없었다. 김과 배<sup>20</sup>의 인장력 자극과 IL-1β가 치주인대 섬유아세포의 collagenase와 TIMP-1의 발현에 미치는 영향에 관한 연구에서는 치주인대 세포에 기계적 자극과 IL-1β 투여를 한 결과 각각의 경우 세포의 형태변화와 MMP-1와 TIMP-1 mRNA의 증가를 보고하였다.

Bolcato-Bellemin 등<sup>49</sup>의 실험에서는 치은세포와 치주인대 세포에 인장력을 가한 결과 MMP-1, MMP-2, TIMP-1은 mRNA가 유도되고 MMP-9은 유도되지 않았다. 여러 실험들의 다양한 MMP와 TIMP의 결과는 기계적 자극의 주기와 정도의 실험방법상의 차이에 의한 것으로 생각되며 기계적 자극에 대한 치주인대 세포의 collagen 대사에 관한 세분화된 연구가 필요할 것으로 생각된다. 결국 Kanzaki 등<sup>12</sup>의 압박력 실험 결과와 비교해 볼 때 인장력이라는 기계적 자극의 의해 파골세포 분화기전이 억제되는 것으로 생각된다.

치아이동 시 골개조 기전은 압박부위에서는 압박력의 반응으로 파골세포 분화 유도인자인 IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>의 생성이 증가하고 연쇄적으로 OPG가 감소하고 RANKL은 증가함에 따라 파골세포 분화기전이 촉진되어 골흡수 기전이 증가하는 결과를 보인다. 한편 인장부위에서는 인장력의 반응으로 IL-1 $\beta$ 와 PGE<sub>2</sub>의 생성이 감소하고 그에 따라서 RANKL이 감소하고 OPG가 증가함에 따라 파골세포 분화기전이 억제되어 골흡수 기전이 감소하는 결과를 보인다 (Fig 10). 그러나 골대사의 전체적인 기전 규명을 위해서는 치주인대세포, 골아세포, 파골세포에서 생성될 수 있는 여러 인자들의 총괄적인 연관성 뿐만 아니라 외부 자극에 대한 세포내 생물학적 신호전달 체계에 관한 연구가 필요하리라 생각된다. 그리고 생체의 유사한 조건을 재현하기 위한 세포실험의 분자생물학적 연구방법의 개선과 시도가 더불어 필요하다.

### 결 론

치주인대 세포가 배양된 유연한 성장표면을 가진 배지에 지속적이고 점진적인 인장력을 가하고 PGE<sub>2</sub>와 ALP의 생성량을 1, 3, 6, 12시간 후에 측정하여 골흡수와 골형성 인자를 정량비교 하였다. 그리고 파골세포분화와 collagen 분해기전에 관여하는 OPG, RANKL, MMP-1, -8, -9, -13, TIMP-1의 역전사 중합효소 연쇄반응검사를 하여 이들 물질의 m-RNA 발현을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대 세포에 인장력을 가한 경우 1시간 후 대조군보다 PGE<sub>2</sub>의 농도가 적었고 ( $p < 0.05$ ) ALP의 농도 변화는 없었다.
2. 치주인대 세포에 인장력을 가한 경우 OPG의 mRNA 발현이 증가하였으나, RANKL의 mRNA

발현은 감소하였다.

3. 치주인대 세포에 인장력을 가한 경우 12시간 후 TIMP-1과 MMP-1, -8, -9, -13의 mRNA 발현이 대조군과 차이가 없었다.

이 연구에서 사람의 치주인대 세포는 점진적이고 지속적인 인장력에 대한 반응으로 PGE<sub>2</sub>의 생성과 RANKL의 mRNA 발현은 감소하고 OPG의 mRNA 발현은 증가하였다. 결과적으로 인장력의 기계적 자극이 치주인대조직의 골흡수 효과를 억제함으로써 치조골 개조에 기여하는 것으로 나타났다.

### 참 고 문 헌

1. Lindauer SJ, Britto AD. Biological response to biomechanical signals: Orthodontic mechanics to control tooth movement. *Semin Orthod* 2000;6:145-54.
2. Whedon G. Disuse osteoporosis: physiological aspects. *Calcif Tissue Int* 1984;36:146-50.
3. Loomer PM. The impact of microgravity on bone metabolism in vitro and in vivo. *Crit Rev Oral Bio Med* 2001;12:252-61.
4. Bradney M, Pearce G, Naughton G, Sullivan C, Bass S, et al. Moderate exercise during growth in prepubertal boys: changes in bone mass, size, volumetric density and bone strength: a controlled prospective study. *J Bone Miner Res* 1998;13:1814-21.
5. Roberts WE. Bone physiology of tooth movement, ankylosis, and oss-eointegration. *Semin Orthod* 2000;6:173-82.
6. Calvalho RS, Bumann A, Schwarzer C, Scott E, Yen EH. A molecular mechanism of integrin regulation from bone cells stimulated by orthodontic forces. *Eur J Orthod* 1996;18:227-35.
7. Basdra EK. Biological reactions to orthodontic tooth movement. *J Orofac Orthop* 1997;58:2-15.
8. Roberts WE, Goodwin WC Jr, Heiner SR. Cellular response to orthodontic force. *Dent Clin North Am* 1981;25:3-17.
9. Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: An in vitro analysis. *Eur J orthod* 1997;19:615-21.
10. Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J. Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* 2000;67:163-72.
11. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-53.
12. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand up-regulation via Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *J Bone and Miner Res* 2002;17:210-20.
13. Davidovitch Z, Shanfeld JL. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) levels in alveolar bone of orthodontically treated cats. *J Dent Res* 1980;59:977.
14. Grieve WG, 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;105:369-74.
15. Rody WJ, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J of Orthod Dentofacial*

- Orthop 2001;120:477-89.
16. De Pasquale V, Franchi M, Govoni P, Guizzardi S, Raspanti M, Poppi V, Ruggeri A. Striae albae: a morphological study on the human skin. *Basic Appl Histochem* 1987;31:475-86.
  17. Sudhir K, Wilson E, Chatterjee K, Ives HE. Mechanical strain and collagen potentiate mitogenic activity of angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1993;92:3003-7.
  18. Redlich M, Shoshan S, Palmon A. Gingival response to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116:152-8.
  19. Davidovitch Z, Shanfeld JL, Montgomery PC, Lally E, Laster L, Furst L, Korostoff E. Biochemical mediators of the effects of mechanical forces and electric currents on mineralized tissues. *Calcif Tissue Int* 1984;36:86-97.
  20. 김명립, 배창. 기계적 자극과 interleukin-1 $\beta$ 가 치주인대 섬유아세포의 collagenase와 TIMP-1의 발현에 미치는 영향. *대치교정지* 1998;28:165-74.
  21. 윤덕상, 이기수. 마우스에서 IL-1 $\beta$ 가 염증의 발현에 미치는 영향에 관한 연구. *대치교정지* 1998;28:611-26.
  22. 송현섭, 김상철. Vitamin D $_3$ 와 TGF- $\beta$ 가 치주인대 세포 활성화에 미치는 영향에 관한 연구. *대치교정지* 1998;28:627-40.
  23. 최현실, 노준. 인장력과 압박력이 사람 치주인대 세포의 PGE $_2$  생성에 미치는 영향에 대한 in vitro 연구. *이화여자대학교 대학원 박사논문*; 2000.
  24. Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue Reactions in Orthodontics. *Orthodontics- Current Principles and Techniques*. St Louis: CV Mosby, 2000;117-91.
  25. Rygh P, Bowling Kevin, Hovlandsdal L, Williams S. Activation of the vascular system: A main mediator periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1986; 89:453-68.
  26. Murrell EF, Yen EH, Johnson RB. Vascular changes in the periodontal ligament after removal of orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;110:280-6.
  27. Somjen D, Binderman I, Berger E, Harell A. Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E $_2$  mediated. *Biochim Biophys Acta* 1980;627:91-100.
  28. Yeh CK, Rodan GA. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcif Tissue Int* 1984;36:67-71.
  29. Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. *J Cell Sci* 1985;75:35-42.
  30. Hasegawa S, Sato S, Saito S, Suzuki Y, Brunette DM. Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcif Tissue Int* 1985;37:431-6.
  31. Sandy JR, Meghji S, Scutte AM, Harvey W, Harris M, Meikle MC. Murine osteoblasts release bone-resorbing factors of high and low molecular weights: stimulation by mechanical deformation. *Bone Miner* 1989;5:155-68.
  32. Winston FK, Macarak EJ, Gorfien SF, Thibault LE. A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell. *Appl J Physiol* 1989;139:397-405.
  33. Ngan PW, Crock B, Varghese J, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z. Immunohistochemical assessment of the effect of chemical and mechanical stimuli on cAMP and prostaglandin E levels in human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 1988;33:163-74.
  34. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Ozawa Y, Saito K, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 beta production by human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 1994;29:328-33.
  35. Agarwal S, Chandra CS, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Baran C. Regulation of periodontal ligament cell functions by interleukin-1beta. *Infect Immun* 1998;66:932-7.
  36. Saito M, Saito S, Ngan W. Interleukin-1beta and prostaglandin E $_2$  are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:226-40.
  37. Ngan PW, Saito S, Saito M. The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 $\beta$  on prostaglandin E $_2$  and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblast in vitro: comparison with cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* 1990;9:717-25.
  38. Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E $_2$  production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 1994;39:877-84.
  39. Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, Ngan P, Lanese R, Davidovitch Z. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108:402-9.
  40. Long P, Hu J, Piesco N, Buckley M, Agarwal S. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1beta-dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cell in vitro. *J Dent Res* 2001;80:1416-20.
  41. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol* 2001;46:185-9.
  42. Waddington RJ, Embery G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod* 2001;28:281-90.
  43. Saito S, Ngan P, Rosol T, Saito M, Shimizu H, Shinjo N, Shanfeld J, Davidovitch Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res* 1991;70:27-33.
  44. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhtiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:307-12.
  45. Duncan GW, Yen EH, Pritchard ET, Suga DM. Collagen and prostaglandin synthesis in force-stressed periodontal ligament in vitro. *J Dent Res* 1984;63:665-9.
  46. Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 1997;19:29-37.
  47. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
  48. Rubin J, Murphy T, Nanes MS, Fan X. Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:1126-32.
  49. Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, Fausser JL, Haikel Y, Tenenbaum H. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2000;79:1712-6.

- ORIGINAL ARTICLE -

## The effect of progressive tensional force on mRNA expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor $\kappa$ B ligand in the human periodontal ligament cell

Kie-Joo Lee, DDS, MSD,<sup>a</sup> Syng-Il Lee, DDS, MSD, PhD,<sup>b</sup> Chung-Ju Hwang, DDS, MSD, PhD,<sup>c</sup>  
Seung-Ho Ohk, PhD,<sup>d</sup> Yu-Shin Tian, DDS, MSD<sup>e</sup>

Tooth movement is a result of mutual physiologic responses between the periodontal ligament and alveolar bone stimulated by mechanical strain. The PDL cell and osteoblast are known to have an influence on bone formation by controlling collagen synthesis and alkaline phosphatase activation. Moreover, recent studies have shown that the PDL cell and osteoblast release osteoprotegerin (OPG) and the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) to control the level of osteoclast differentiation and activation which in turn influences bone resorption. In this study, progressively increased, continuous tensional force was applied to PDL cells. The objective was to find out which kind of biochemical reactions occur after tensional force application and to illuminate the alveolar bone resorption and apposition mechanism. Continuous and progressively increased tensile force was applied to PDL cells cultured on a petriperm dish with a flexible membrane. The amount of PGE<sub>2</sub> and ALP synthesis were measured after 1, 3, 6 and 12 hours of force application. Secondly, RT-PCR analysis was carried out for OPG and RANKL which control osteoclast differentiation and MMP-1, -8, -9, -13 and TIMP-1 which regulate the resolution of collagen and resorption of the osteoid layer. According to the results, we concluded that progressively increased, continuous force application to human PDL cells reduces PGE<sub>2</sub> synthesis, and increases OPG mRNA expression.

Korean J Orthod 2005;35(4):262-74

※ **Key words:** Mechanical strain, Periodontal ligament cell, Osteoprotegerin, Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand

<sup>a</sup> Graduate Student, <sup>c</sup> Professor, Department of Orthodontics, College of Dentistry, Yonsei University

<sup>b</sup> Professor, <sup>e</sup> Graduate Student, Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University

<sup>d</sup> Assistant Professor, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Chonnam National University

Reprint requests: **Chung-Ju Hwang**

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Yonsei University, 134 Shinchon-Dong, Seodaemun-Gu, Seoul 120-752, Korea

+82 2 361 8792

hwang@yumc.yonsei.ac.kr

Received October 10, 2004; Last Revision January 10, 2005; Accepted February 5, 2005