

## 인도메타신의 투여가 치아 맹출 시 기질금속단백분해 효소의 분포에 미치는 영향

강 윤 구<sup>a</sup> · 남 종 현<sup>b</sup> · 이 기 수<sup>c</sup>

이 연구는 치낭과 그 주위 조직 세포에서 matrix metalloproteinase (MMP)-3과 -9의 발현에 대한 인도메타신의 영향을 관찰하여 인도메타신이 치아의 맹출에 미치는 영향의 일단을 규명하기 위해 시행되었다. 생후 10-12주된 10마리의 개를 실험군 8마리와 대조군 2마리로 나누고 실험군은 인도메타신을 체중에 대하여 통상적 복용량인 인도메타신 2 mg/Kg/day을 7일간 및 14일간 투여한 군과 과량의 8 mg/Kg/day을 7일간 및 14일간 투여한 군으로 나누고 대조군은 빈 캡셀을 placebo로 투여한 후 희생하고 맹출 중인 영구치 치배를 적출하여 조직 처리하고 H-E 염색 및 MMP-3과 -9에 대한 면역염색 시행 후 광학현미경으로 검경하였다. 관찰결과 대조군에서는 파골세포, 조골세포, 치주인대 세포, 법랑모세포 및 상아모세포에서 모두 MMP-3과 -9의 발현이 뚜렷하게 관찰되었다. 대조군에 비해 인도메타신 투여군에서 파골세포, 조골세포, 치주인대 세포는 MMP-3과 -9의 발현이 억제된 소견이 관찰되었으며 인도메타신의 투여기간이 길수록 투여량이 많을수록 더 뚜렷하게 관찰되었다. 법랑모세포와 상아모세포는 대조군과 실험군의 MMP-3과 -9의 발현의 차이가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에 의하면 prostaglandin (PG) 생합성 억제제인 인도메타신은 치낭의 파골세포, 조골세포 및 치주인대 세포에서 MMP-3과 -9의 발현을 억제하였으며 이는 인도메타신 투여로 치아 맹출이 억제될 수 있음을 시사한다.

( 주요 단어: 인도메타신, 치아 맹출, 기질금속단백분해 효소 )

### 서 론

치아의 맹출은 골의 흡수와 형성을 동반하며 주위 조직의 지속적인 재형성을 필요로 한다.<sup>1</sup> 치아 맹출 시 골흡수에는 치낭이 중요한 조직으로 치아 맹출에 필요한 국소적인 대사 활성을 조정하고 파골세포의

유입 및 활성화에 관계된 분자들을 함유한다고 보고되었다.<sup>2,3</sup> 또한 치근 형성이 개시되고 진행됨에 따라 치근 부위의 치낭은 점차적으로 치주인대로 대체되며 치아의 맹출 과정에는 치주인대의 재형성이 필요한 것으로 보고되었다.<sup>4,5</sup>

골흡수는 산성화에 의한 무기질의 용해와 주로 (90% 이상) I형 교원질로 구성되어 있는 골 유기기질 분해로 2단계 과정을 거친다.<sup>6,7</sup> 이 중 유기기질 분해는 단백질분해 효소, 특히 기질금속단백분해 효소(matrix metalloproteinase, 이하 MMP)와 시스테인 단백질분해 효소(cysteine proteinase)가 담당한다.<sup>7,8</sup> MMP는 세포외기질의 단백질을 분해를 일으키는 효소로서 calcium-dependent zinc endoproteinases의 일

<sup>a</sup> 대학원생, <sup>b</sup> 조교수, <sup>c</sup> 교수, 경희대학교 치의학전문대학원 교정학교실, 교신저자: 이기수

서울시 동대문구 회기동 1

경희대학교 치의학전문대학원 교정과 / 02-958-9390

kisslee@khu.ac.kr

원고접수일: 2005년 6월 24일 / 원고최종수정일: 2005년 10월

25일 / 원고재택일: 2005년 10월 27일

원으로 다양한 세포에 의해 분비되며 생리적인 pH에서 활성을 가진다.<sup>9</sup> MMP는 모든 형태의 교원질을 분해할 수 있기 때문에 골흡수 외에도 정상 조직 개조, 관절염, 암종 전이, 창상 치유, 혈관 생성, 염증, 배아 발육 등에 연관되어 있으며<sup>10</sup> 최근에는 치아의 형성<sup>11-15</sup> 및 치주인대의 재형성에도<sup>4</sup> 관여하는 것으로 보고되었다. 백서를 대상으로 collagenase 억제제인 bisphosphonate를 투입하였을 때 치아의 맹출이 지연되었고,<sup>16</sup> MT1-MMP를 유전적으로 제거한 쥐에서 치아의 맹출이 지연되었음이 보고되어<sup>17</sup> MMP의 역할은 치아의 맹출을 지연시킬 수 있음이 보여졌다.

MMP와 골흡수는 밀접한 연관을 가지며 골흡수를 유도하는 cytokine인 interleukin (IL), tumor necrosis factor (TNF) 그리고 prostaglandin (PG)에 의해 분비가 증가하는 것으로 보고되었다.<sup>9,10,18</sup> MMP는 파골세포의 이주 및 모집에 중요한 역할을 하며 골 표면에 작용하여 비광화된 유기 기질을 제거함으로써 파골세포가 무기질에 접촉하고 활성화할 수 있게 하는 것으로 보고되었다.<sup>7,19-21</sup> Blavier와 Delaisse<sup>19</sup>은 생쥐의 발육 중인 중족골의 골수강을 배양하고 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 양성 세포의 이동을 관찰한 결과 대조군에서는 세포가 유골층을 통과하여 연골조직내로 침투하여 골수강을 형성하였으나 MMP 억제제를 투여한 실험군에서는 이러한 TRAP 양성 세포의 이동이 완전히 차단된 것을 관찰하고 MMP가 (전)파골세포의 이주에 중요하며 파골세포에 의한 골흡수의 개시 시기 및 부위를 결정하는 기전에 있어서 중요한 요소라고 결론지었다. Everts 등<sup>21</sup>은 부갑상선 호르몬으로 자극시키고 배양한 mouse의 두개골에 시스테인 단백분해 효소에 대한 억제제와 MMP에 대한 억제제를 각각 처치한 결과 두 실험군에서 대조군에 비하여 골흡수가 억제된 것을 관찰하고 시스테인 단백분해 효소 및 MMP 모두 파골세포의 골흡수 소와 내에서 교원질성 골기질의 분해에 연관되어 있다고 보고하였다. 또한 치조골의 파괴와 연관된 치주질환에 관한 연구에서도 MMP가 골흡수와 연관되어 있음이 보고되었다.<sup>22,23</sup>

MMP-3과 -9는 골재형성과 연관이 입증된 MMP이다. 이 중에서 특히 MMP-9는 파골세포에서 발현되는 MMP 중에서 가장 잘 정립되어 있으며 파골세포에서 강하게 발현되는 것으로 보고되었다.<sup>8</sup> MMP-9는 I형, III형, IV형, V형 교원질 및 변성된 교원질을 분해할 수 있는 넓은 기질 특이성을 가지며 파골세포의 이주 및 모집에 있어서 중요한 역할을 하고 파골

세포의 분화 초기에서부터 발현되기 시작하는 것으로 보고되었다.<sup>22,24</sup> 또한 활성적인 치근 흡수조직에서의 파치세포에서도 발현되는 것이 관찰되었다.<sup>25</sup> MMP-3은 stromelysin-1이라고도 하며 III형, IV형, IX형 교원질 분해능을 가지나 여타의 MMP와는 달리 fibronectin, laminin, elastin, IgG, 그리고 proteoglycans 같은 비교원성 결합조직 거대분자도 분해할 수 있다.<sup>26</sup> 또한 proMMP-1, proMMP-9 그리고 proMMP-13의 propeptide domain을 분해하여 활성화시켜서<sup>26</sup> 생체에서 교원질 분해 활성의 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되었다.<sup>27</sup>

인도메타신은 비스테로이드성 항염증제의 하나로 류마티즘성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염, 염증성 치주 질환을 치료하기 위한 약제로서 사용된다. 이 약제는 cyclooxygenase (COX)-1과 -2를 비특이적으로 억제하여 효과적으로 PG의 생성을 억제하며 따라서 염증을 감소시키고 골흡수를 억제한다.<sup>6,28</sup> 시험관 실험에서 사람의 치주 인대 섬유모세포에서 IL-1 $\beta$ 로 유도시킨 PGE2와 IL-6의 생성이 인도메타신의 투여 시 감소되는 것으로 보고되었다.<sup>29</sup> PG은 혈관 확장, 임파구 증식 억제, 혈관 형성, 염증반응, 골흡수 등의 다양한 생물학적인 활성을 가지며 또한 IL-1이나 TNF 같은 cytokines 및 collagenase와 gelatinase 같은 MMP의 분비 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>29-32</sup> PGE2는 골흡수를 촉진시키고 신생골 형성을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 보고되었으며 또한 IL-1 또는 TNF- $\alpha$ 의 세포에 대한 작용을 일부 중재하는 것으로 보고되었다.<sup>28,32</sup> Kawaguchi 등<sup>32</sup>은 PG이 골조직의 생리적 병리적 반응에 중요한 역할을 하며 PG 중에서도 특히 PGE2는 세포내의 cyclic-adenosine monophosphate (cAMP)를 매개체로 하여 파골세포와 조골세포의 전구세포 증식과 분화에 관여하여 골흡수와 골형성을 촉진한다고 보고하였다. 최근의 연구에서 PGE2가 파골세포의 형성 및 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand)의 조골세포 및 치주인대세포에서의 발현을 매개하는 것으로 밝혀졌다.<sup>33,34</sup>

앞에서의 문헌 고찰을 토대로 볼 때 PG과 MMP, 골흡수와 교원질 재형성과의 관계는 Fig 1과 같이 나타낼 수 있다. 치아의 맹출에 필요한 골흡수와 치주인대의 재형성에는 MMP가 관여되어 있으며 이 중에서 특히 골의 재형성에는 MMP-3과 -9가 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 인도메타신 투여 시에 PG의 합

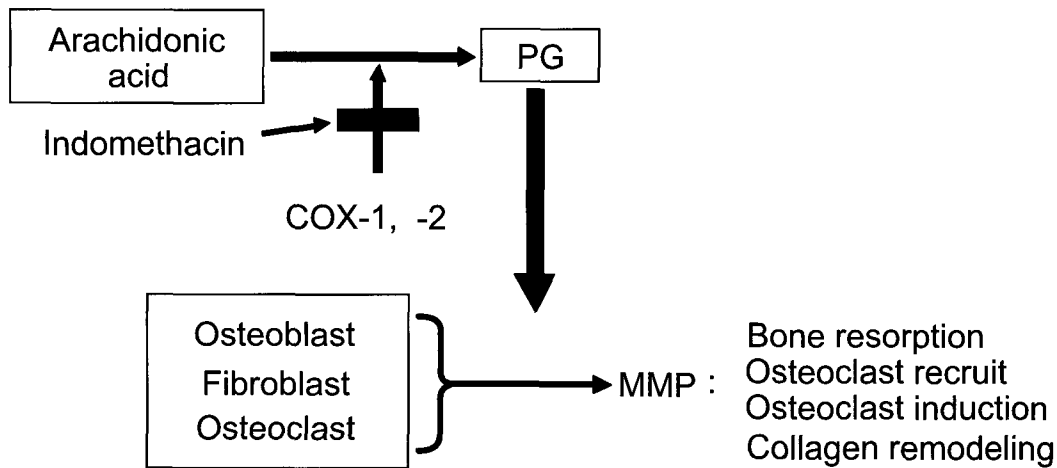


Fig 1. Brief demonstration of the relation between production of PG and MMP.

성 차단으로 파골세포 및 조골세포 그리고 치주인대 세포에서의 MMP 발현이 감소되어 골과 치주인대의 재형성이 감소될 것으로 예상되며 이러한 골과 치주인대의 재형성의 억제제는 치아 맹출 억제를 야기할 수 있다. 그러나 대부분의 MMP에 관한 연구는 in vitro로 시행되었으며 in vivo의 결과를 보고한 연구는 드물고 또한 인도메타신을 투여 시 MMP의 발현이 반대로 증가하였다는 in vitro 연구 결과도 있다.<sup>18,39</sup> 이 연구는 인도메타신의 전신적 투여가 치아 맹출 시 주위 조직의 MMP-3과 -9 분포에 미치는 영향을 in vivo로 규명하기 위해 시행되었다.

### 연구재료 및 방법

#### 실험동물

실험에서 사용된 동물은 체중 5.5-8.9 Kg의 생후 12-13주된 10마리의 잡견으로 1주일간의 사육장 적응 기간을 제공하였고, 구강 상태는 양호하였으며 전신적인 질환은 없었다. 실험기간 동안 아침과 저녁으로 고형사료와 물을 제공하였다.

실험동물은 인도메타신(인테반스펜솔<sup>®</sup>, 유한양행, 서울, 한국)의 통상적 투여량 범위인 2 mg/Kg/day을 7일간 투여한 실험 1군, 14일간 투여한 군을 2군, 과잉투여량인 8 mg/Kg/day를 7일간 투여시킨 실험 3군, 14일간 투여한 군을 4군, 그리고 대조군으로 나누었으며, 각군에 2마리씩 배정하였다. 인도메타신은 12시간 간격으로 하루에 2회 구강으로 투여하였으며,

대조군은 위약으로 빈 캡셀만 투여하였다. 약물은 microbalance로 측정하여 각 실험 동물의 체중에 맞도록 정량하였고 캡셀에 밀봉하여 마취 없이 개의 연하반사가 일어나는 지점까지 구강내로 밀어 넣고 연하를 확인하고, 투여 후에 구도가 없는지를 다시 확인하였다.

실험기간 종료 후 Xylazine (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, 서울, 한국) 5 mg/Kg와 Ketamine (케타민<sup>®</sup>, 유한양행, 서울, 한국) 25 mg/Kg를 정맥내 주사로 마취시킨 후 4 M의 KCl 용액을 정맥내 주사하여 희생시켰으며 연조직을 제거하고 하악골을 절취하였다.

#### 조직 처리 및 검경

절취된 하악골을 정중선에서 좌우로 나누고 즉시 방사선 사진을 촬영하여, 실험에 이용할 치아를 선정하였다. 치아는 방사선 사진상에서 치근단형성이 거의 완료되었고 치근이 형성 개시된 이후의 영구치로서 상방의 치조골이 개방되지 않은 소구치와 대구치를 선정하여 실험동물당 3개씩 절취하고, 10% 중성 포르말린 용액에서 24시간 이상 고정하였다.

치아와 주위조직은 10% EDTA 용액으로 약 8-10주간 탈회하고, 통상적 방법에 따라 파라핀 포매 후, 순설방향과 치아 장축에 따라 5 μm 두께로 절단하여 조직 절편을 만들었다. 통법에 따라 hematoxylin-eosin (H-E) 중염색을 시행하였다. 면역염색은 human breast cancer를 control로 하여 일차항체 중 MMP-3 (Neomarkers, monoclonal, anti-human,

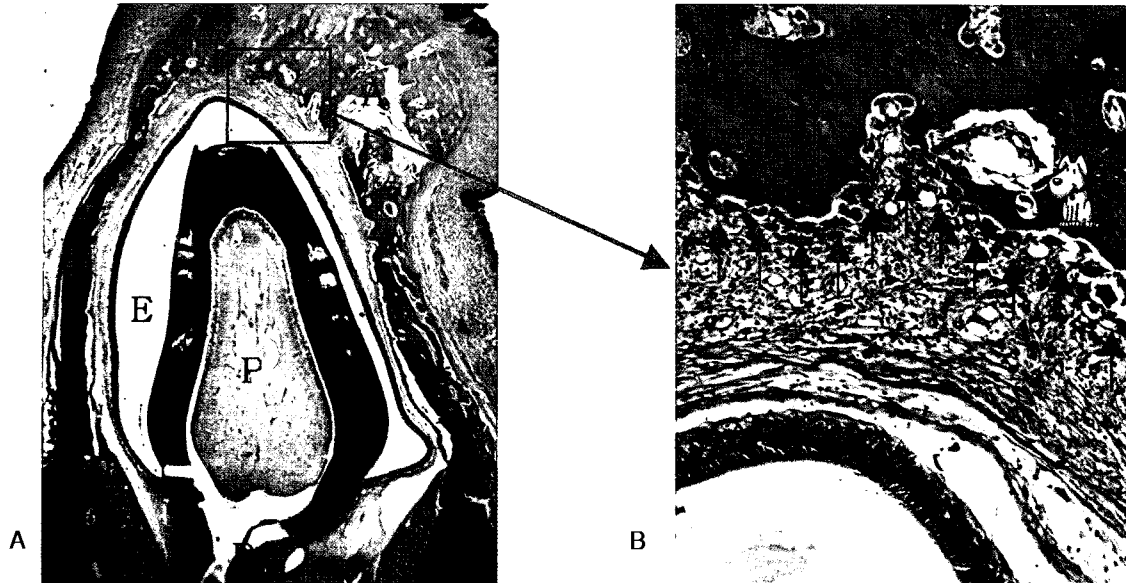


Fig 2. H-E staining of control group. A, Permanent tooth on eruption. x10; B, higher magnification of boxed zone in A. Note the numerous osteoclasts (arrows). x100. A, Alveolar bone; E, enamel; D, dentin; P, tooth pulp; R, tooth root.

California, USA)은 1/10로 희석하고 MMP-9 (Neomarkers, polyclonal, anti-human, California, USA)는 1/100로 희석하여 사용하였으며 면역조직화학 검사를 위해 LSAB (Labelled streptavidine biotin, Dako Co., Glostrup, Denmark) kit를 이용하였다. 이 차향체로는 biotinized anti-mouse IgG (Dako Co., Glostrup, Denmark)를 사용하였고, 발색을 위해서 DAB (Diamino-benzidine, Dako Co., Glostrup, Denmark)를 이용하였다. 대조 염색으로 Meyer's Hematoxylin을 사용하였다.

조직소견은 광학 현미경으로 검경하였으며, Kappa Image Base v.4.5.2를 이용하여 10배, 40배, 100배, 400배 사진을 촬영하였다.

### 연구결과

#### 대조군

##### H-E 염색 소견

맹출중인 영구치 치아의 치관은 긴 원주모양의 법랑모세포로 둘러싸여 있었으며 이러한 법랑모세포 상방에 외법랑상피로 추정되는 조밀한 세포층이 관찰되었다. 법랑기를 둘러싸며 치아와 골사이에 위치

한 성긴 결체조직인 치낭이 관찰되었으며 상방의 치은으로 도대삭에 의해 연결되어 있는 것이 관찰되었다. 치낭은 치아 외면에 평행한 섬유성 조직과 섬유모세포와 유사한 형태를 가지나 좀더 짧고 긴 형태의 미분화간엽세포로 이루어진 성긴 점액섬유결체조직으로 구성되어 있었으며 (Fig 2, A, B) 하방으로는 치근 부위의 치주인대 예정부위와 연결되어 있었다. 치낭과 주위 치조골 사이에는 세포가 좀더 밀집되고 섬유모세포, 중성구와 혈관이 풍부하며 치관 주위 치조골면에는 다수의 파골세포와 조골세포가 관찰되어 골개조가 활발히 일어나고 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig 2, A, B). 치조골면뿐 아니라 치조골내에서도 파골세포와 조골세포를 관찰할 수 있었으며 혈관이 다수 관찰되었고 골소주가 성글게 배열되어 있었다. 발육중인 치아의 하방에는 신생 골조직의 형성과 골 표면의 다수의 조골세포가 관찰되었다.

##### MMP-3과 -9의 면역염색 소견

MMP-3은 발육, 맹출중인 치아 주변의 조직에서 여러 세포에서 염색이 되었다 (Fig 3, A, C, E, G). 파골세포와 조골세포에서 짙게 염색되는 것이 관찰되었으며 인접한 혈관 및 치조골내의 혈관내피세포에서도 관찰되었다 (Fig 3, A, C). 법랑모세포 및 상아

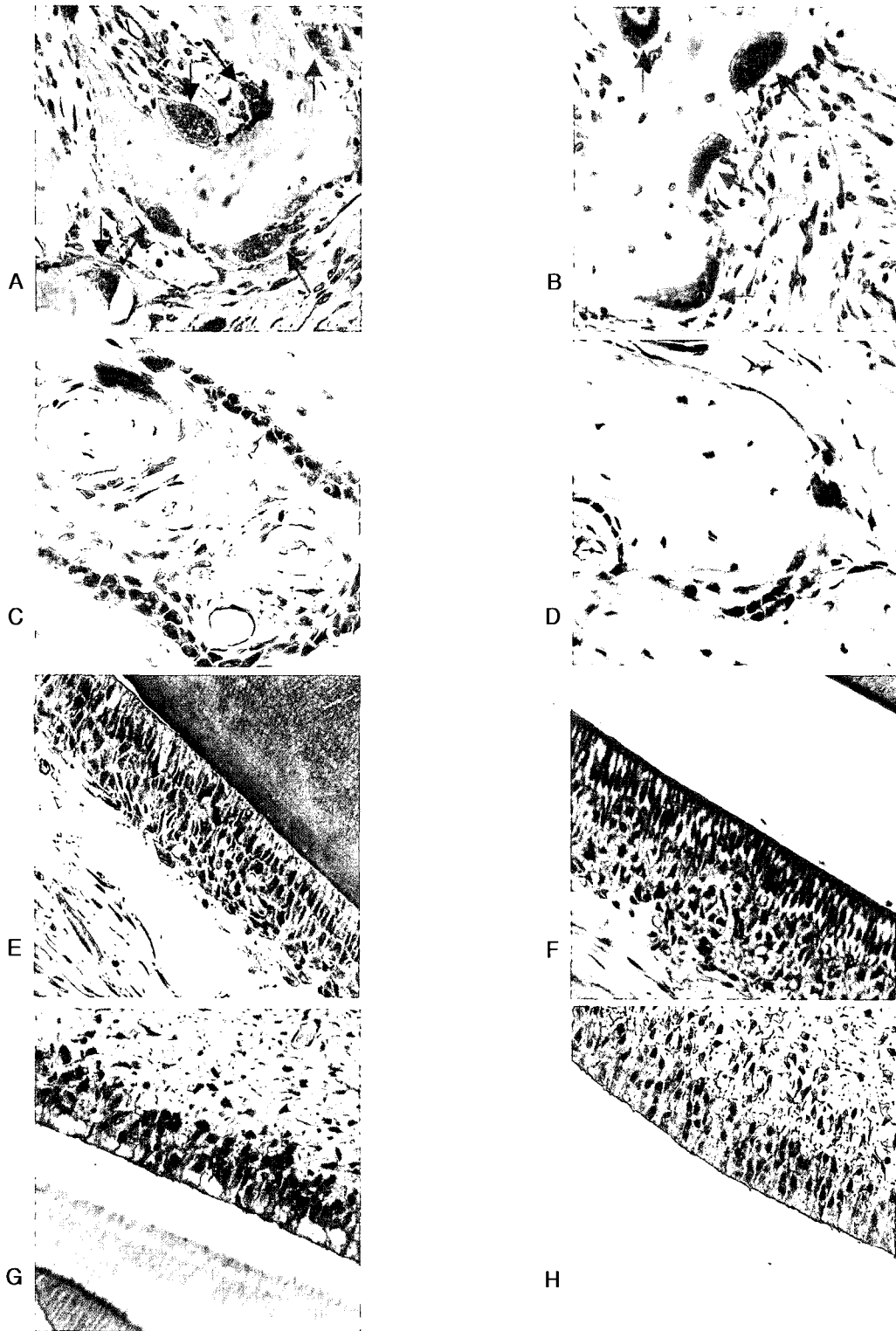
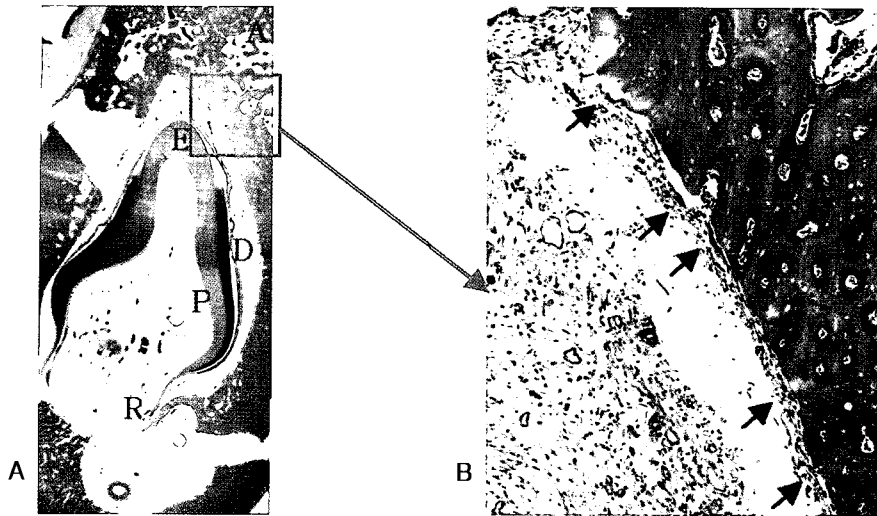


Fig 3. Immunostaining of control group. Osteoclasts (A, MMP-3; B, MMP-9, red arrows), osteoblasts (C, MMP-3; D, MMP-9), ameloblasts (E, MMP-3; F, MMP-9), and odontoblasts (G, MMP-3; H, MMP-9) showed positive staining. x400.



**Fig 4.** H-E staining of experimental group (Group 4, indomethacin 8 mg/Kg/day for 14 days). **A**, Permanent tooth on eruption. x10; **B**, higher magnification of boxed zone in **A**. Osteoclasts (arrows) appeared in smaller number than control group (Fig 2, **B**). x100. **A**, Alveolar bone; **E**, enamel; **D**, dentin; **P**, tooth pulp; **R**, tooth root.

모세포에서도 발현이 보였으며 (Fig 3, *E, F*) 치근과 치조골 사이의 치주인대를 형성할 치주인대 세포들에서 강하게 발현되는 것이 관찰되었다 (Fig 6, *A*). MMP-9는 MMP-3과 유사한 분포로 발현되는 것이 관찰되었으나 (Fig 3, *B, D, F, H*) MMP-9는 파골세포에서 더욱 강하게 발현되는 것이 관찰되었다 (Fig 3, *B*). MMP-3과 같이 치주인대 세포에서도 MMP-9는 강하게 발현되었다 (Fig 7, *A*).

**실험군**

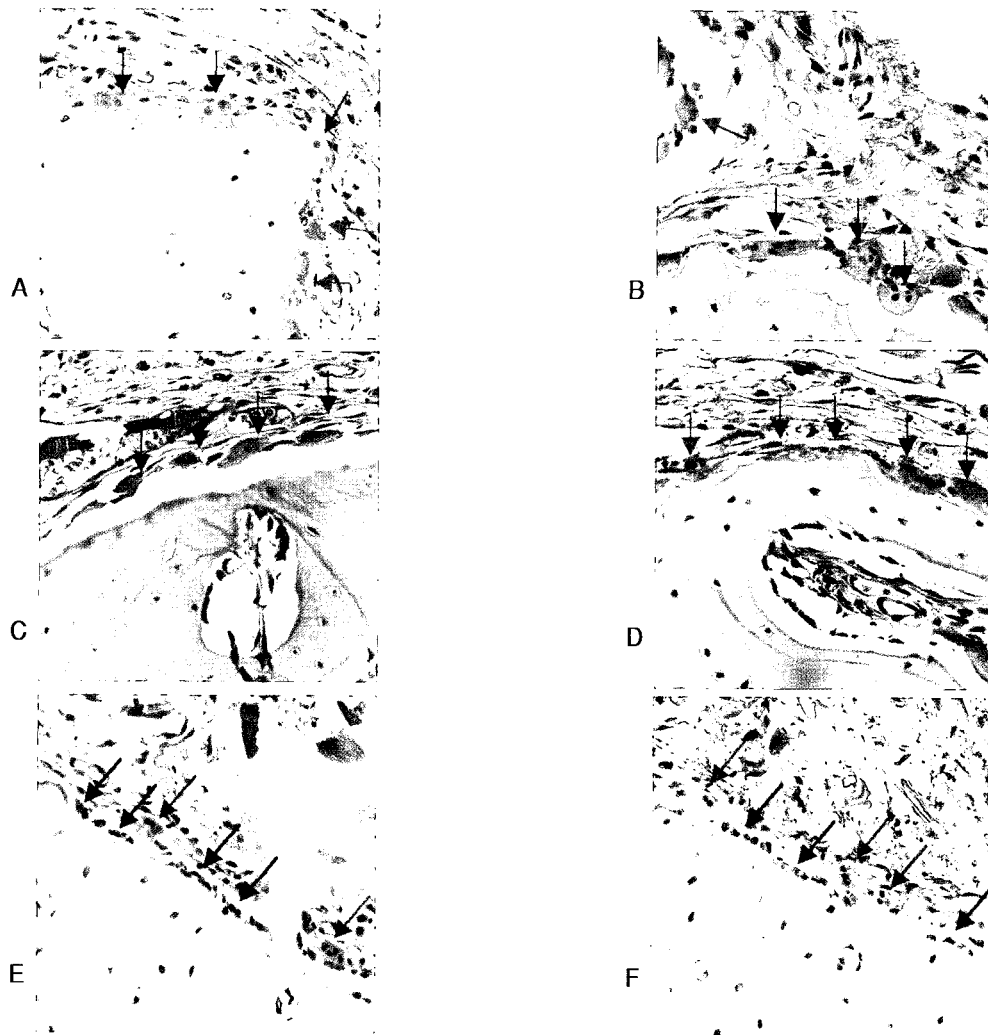
*H-E* 염색 소견

실험 1군(인도메타신 2 mg/Kg/day로 7일 투여), 실험 2군(인도메타신 2 mg/Kg/day로 14일 투여), 실험 3군(인도메타신 8 mg/Kg/day로 7일 투여) 및 실험 4군(인도메타신 8 mg/Kg/day로 14일 투여)은 대체적으로 대조군과 유사한 현미경소견을 보였으나 흡수조직에 인접한 치조골면에 파골세포의 수가 다소 감소된 소견을 보였다 (Fig 4, *A, B*).

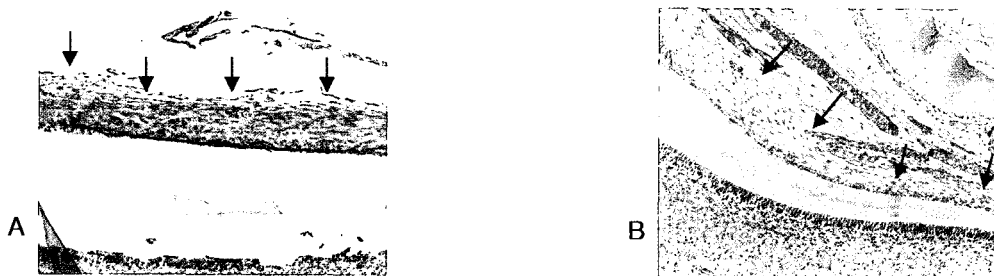
*MMP-3*과 *-9*의 면역염색 소견

MMP-3과 -9의 전반적인 분포는 대조군과 유사하여 파골세포, 법랑모세포, 상아모세포, 치주인대 세포, 혈관내피세포등에서 발현되는 것이 관찰되었다. 그러

나 모든 실험군에서 일부의 파골세포와 조골세포에 MMP-3과 -9에 대한 염색이 부분적으로 되지 않는 것을 관찰할 수 있었으며 (Fig 5) 투여 시간과 투여 용량을 증가시킨 군에서 더 억제되었다. 실험 4군 (인도메타신 8 mg/Kg/day로 14일 투여)의 경우는 MMP-9에 대한 양성의 염색 소견을 보이는 파골세포를 관찰하기 힘들 정도로 발현이 감소된 소견을 보였다 (Fig 5, *F*). MMP-3의 경우에도 실험군의 파골세포에서 염색이 감소하는 소견을 보였으나 그 정도는 MMP-9에 비해 뚜렷하지 않았다 (Fig 5, *E*). 이러한 감소 소견은 치근부의 치주인대에서도 나타났다. MMP-3과 -9는 모두 실험군에서 대조군에 비하여 치근부위의 치주인대에서 염색도가 떨어지는 것이 관찰되었으며 (Figs 6, *B* and 7, *B*) 그 정도는 MMP-3이 더 뚜렷하여 실험 4군의 경우에는 치근부위의 치주인대에서 MMP-3의 발현이 거의 없었다 (Fig 6, *B*). 법랑모세포와 상아모세포는 실험군과 대조군에서 차이를 나타내지 않고 균일하게 MMP-3과 -9에 대해 염색되었다. 실험 2군 (인도메타신 2 mg/Kg/day로 14일 투여)과 실험 3군 (인도메타신 8 mg/Kg/day로 7일 투여)에서도 파골세포에서 MMP-3과 -9가 감소된 소견이 관찰되었다 (Fig 5, *A-D*).



**Fig 5.** Immunostaining of experimental group osteoclasts (red arrows), and osteoblasts (black arrows). Group 2 (indomethacin 2 mg/Kg/day for 14 days. A, B, Group 3 (indomethacin 8 mg/Kg/day for 7 days); C, D, Group 4 (indomethacin 8 mg/Kg/day for 14 days); E, F, almost or all osteoclasts and osteoblasts were negatively stained for MMP-3 (A, C, E) and MMP-9 (B, D, F). x400.



**Fig 6.** Immunostaining (MMP-3) of periodontal ligaments on developing root. A, Control group showed positive staining. x100; B, experimental group (Group 4, indomethacin 8 mg/Kg/day for 14 days) showed negative staining. x100.



Fig 7. Immunostaining (MMP-9) of periodontal ligaments on developing root. A, Control group showed positive staining. x40; B, experimental group (Group 4, indomethacin 8 mg/Kg/day for 14 days) showed negative staining. x40.

**총괄 및 고찰**

실험결과 MMP-3과 -9는 치낭과 치조골면 사이에서 강하게 발현되어 치낭 전체적으로도 MMP-9가 발현되지만 치조골에 접한, 즉 활동적인 골개조 부위에서 더욱 집중적으로 발현되는 것이 관찰되었다. 이는 파골형성과 MMP-3과 -9가 관계가 높다는 이전의 연구 결과들과도 일치하며 또한 파골세포가 충원되고 위치되어야 할 부위에서 강하게 발현되어 파골세포에 대한 화학주성의 효과 및 파골형성을 개시하게 한다는 문헌<sup>7,19-24</sup> 과도 같은 결과이다. 전체적으로 MMP-3과 -9의 분포는 서로 유사하였으며 파골세포에서 MMP-9가 주요하게 발현되는 것으로 관찰되어 Garnero 등<sup>8</sup>과 Kusano 등<sup>9</sup>이 보고한 소견과 일치하였다. MMP-3과 -9의 발현이 치주인대 세포에서도 강하게 발현되어 이 부분의 교원질 재형성이 활발하게 일어나서 치아 맹출 동안 계속적으로 치주인대의 재형성이 일어난다는 문헌과 일치하였다.<sup>4,5</sup>

인도메타신을 투여한 실험군에서 MMP의 전반적인 분포 양상은 변하지 않았으나 일부 파골세포에서 MMP-3과 -9에 대한 염색이 부분적으로 나타나지 않거나 전체적으로 나타나지 않는 소견이 관찰되었다. 이러한 소견은 인도메타신의 투여량이 크고, 투여기간이 긴 군에서 더 뚜렷하게 나타났으며 이는 PG이 MMP의 생성을 촉진하며<sup>35</sup> 인도메타신의 투여로 인한 PG의 생성 억제와 MMP의 발현을 억제하였다고 보고한 연구들과<sup>36,37</sup> 일치한다. MMP는 파골세포의 파골작용에 필요한 효소이므로 인도메타신의 투여로 인해 파골작용이 감소한 것으로 유추할 수 있으며 따라서 맹출로 형성이 지연되어 치아 맹출이 억제될 가능성이 있다. 그러나 이 연구에서는 MMP에 대한 정

성적인 결과만을 얻을 수 있었고 정량적인 분석은 불가능하여 인도메타신이 MMP의 발현에 미치는 영향의 정확한 파악은 어려웠으며 따라서 western blotting과 같은 정량적인 분석을 할 수 있는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 실험군에서는 치주인대 부위의 MMP의 발현이 감소되어 인도메타신의 투여가 치주인대의 재형성을 억제할 가능성이 있음이 관찰되었다.<sup>4</sup>

대조군에 비하여 실험군에서 법랑모세포와 상아모세포에서의 MMP-3과 -9의 분포 변화는 관찰할 수 없었으며 따라서 법랑모세포와 상아모세포에서의 MMP-3과 -9의 발현은 PG에 비의존적으로 발현되거나 다른 보상기전이 있는 것으로 보인다. 실제로 막내골화로 형성되는 두개골과 연골내골화로 형성되는 장골에서의 파골세포를 각각 배양하고 골흡수를 실험한 Everts 등<sup>38</sup>은 시스테인 단백질분해효소에 대한 억제제와 MMP 억제제를 투여한 결과 장골에서 얻어진 파골세포는 시스테인 단백질분해효소 억제제 투여 시 골흡수능이 억제되었으나 MMP 억제제에 의해서는 골흡수능이 영향을 받지 않았으며 두개골에서 얻어진 파골세포는 두 억제제 모두에 의해 골흡수능이 억제된 것을 관찰하고 같은 파골세포라도 기능적으로 서로 다른 소집단이 존재하며 각각이 다른 전구세포에서 기원했을 가능성에 대하여 제시하였다. 또한 Callejas 등<sup>36</sup>은 COX-2 억제제를 백서의 태아 간세포에 투여 시에 지질다당류에 의해 증가되었던 MMP-2와 -9가 억제됨을 보고하였고 Oh 등<sup>37</sup>은 COX-2 억제제를 위암 세포주에 투여한 결과 MMP-2의 발현이 억제된 것을 관찰하였다. 그러나 Kyrkanides 등<sup>18</sup>은 혈관내피세포를 배양하여 IL-1 투여 시에 MMP-2와 -9의 합성이 증가하며 인도메타신을 투여 시 MMP-2



와 -9의 활성이 더욱 증가함을 관찰하였으며 이 등<sup>39</sup>도 인간 영양배엽세포주에 COX-2 억제제를 투여 시에 MMP-2와 -9의 발현이 증가하였음을 관찰하였다. 이러한 상반된 결과들은 사용된 COX 억제제의 종류와 유도시킨 세포의 종류에 따라서 MMP의 발현이 서로 다른 것을 보여주며 또한 같은 파골세포라도 그 기원과 기능에 따라 MMP의 역할이 다르다는 것으로 사료된다. 또한 사용된 COX 억제제의 종류와 실험에 사용된 조직의 종류가 서로 다른 것도 그 이유의 하나로 보인다. 이 연구에서는 치아 맹출 시에 COX 억제제를 투여했을 때 특히 파골세포와 치주인대 세포에서 MMP-3과 -9가 억제되었음이 관찰되었으며 이는 세포내에서의 MMP 생성은 PGE2-cAMP 의존성 기전에 의하며 따라서 COX-2의 유도는 PGE2의 생성으로 이어지며 이 PGE2가 MMP의 생성을 일으키는 신호 전달 체계에 관련되어 있다는 기존의 연구들과 일치한다.<sup>40,41</sup>

치배 발생 시 MMP-2와 -9의 발현을 연구한 Heikinheimo와 Salo<sup>11</sup>는 후기 모상기와 초기 종상기의 치배에서 MMP-2가 내법랑상피, 치아 유두 그리고 치낭에서 검출되었으며 MMP-9는 치아 형성기에는 발현이 저조한 것을 보고하였다. 이들은 치배 발생 시의 상피간엽세포의 상호작용에 기저막요소 및 MMP같은 단백질분해효소가 관련된다고 하였으며 또한 MMP와 다른 단백질분해효소가 법랑질 형성 및 상아질 형성에 관여한다고 하였다. 또한 MMP-3이 발육중인 법랑 기질에서, 특히 상아-법랑 경계를 따라서 발현되는 것이 보고되었으며 따라서 MMP-3이 법랑 기질 단백질의 분해 또는 법랑질 형성 동안 세포 구조의 조절에 관여하는 것으로 보고되었다.<sup>42</sup> MMP는 치아의 형성기부터 발육기까지 관련이 깊으며 특히 법랑질과 상아질의 형성 시 amelogenin과 교원질 같은 기질 단백질의 제거에 중요할 것으로 보인다.<sup>45</sup> 이 실험에서는 MMP-3과 -9 모두가 법랑모세포 및 상아모세포에서 발현되는 것이 관찰되었으며 실험에 사용된 치아는 법랑질과 상아질 형성 중에 있기 때문에 이러한 단백질분해효소가 법랑질과 상아질의 형성에 관여한다는 위의 논문들을 지지한다. MMP-9가 치아 형성 초기에는 발현이 저조했었다는 보고<sup>11</sup>와 이 연구 결과를 비교하여 볼 때 치아 발육 시기에 따라서 발현되는 MMP의 종류가 다르며 매우 복잡하고 정밀하게 조절되는 과정으로 치아가 형성되는 것으로 사료된다.<sup>11-14</sup>

## 결론

치아의 맹출은 치낭 및 그 주위 조직의 재형성을 필요로 한다. 이 연구는 치낭과 그 주위 조직 세포에서 MMP-3과 -9의 발현에 대한 인도메타신의 영향을 관찰하여 인도메타신의 투여가 치아의 맹출에 미치는 영향의 일단을 규명하기 위해 시행되었다.

생후 10-12주된 10마리의 개를 실험군 8마리와 대조군 2마리로 나누고 실험군은 인도메타신을 체중에 대하여 통상적 복용량인 인도메타신 2 mg/Kg/day을 7일간 및 14일간 투여한 군과 과량의 8 mg/Kg/day을 7일간 및 14일간 투여한 군으로 나누고 대조군은 빈캡셀을 위약으로 투여한 후 희생하고 맹출중인 영구치 치배를 적출하여 조직 처리하여 H-E염색 및 MMP-3과 -9에 대한 면역염색 시행 후 치낭 및 그 주위 조직의 파골세포, 조골세포, 치주인대 세포, 법랑모세포 및 상아모세포를 광학현미경으로 검경하였으며 관찰된 결과는 다음과 같다.

1. 대조군에서는 파골세포, 조골세포, 치주인대 세포, 법랑모세포 및 상아모세포에서 모두 MMP-3과 -9의 발현이 뚜렷하게 관찰되었다.
2. 인도메타신 투여군과 대조군에서 법랑모세포와 상아모세포는 MMP-3과 -9의 발현의 차이가 관찰되지 않았다.
3. 인도메타신 2 mg/Kg/day 7일 투여군에서 파골세포, 조골세포, 치주인대 세포는 MMP-3과 -9의 발현이 일부 억제된 소견이 관찰되었으며 14일군에서는 더 많은 억제 소견이 관찰되었다.
4. 인도메타신 8 mg/Kg/day 7일 투여군에서 파골세포, 조골세포, 치주인대 세포는 MMP-3과 -9의 발현 억제가 뚜렷이 나타났고 14일군에서는 발현이 거의 관찰되지 않았다.
5. 인도메타신에 의한 MMP-3과 -9의 발현 억제는 투여기간이 길수록, 투여량이 클수록 더 뚜렷한 것으로 나타났다.

이상의 결과에 의하면 PG 생합성 억제제인 인도메타신은 치낭의 파골세포, 조골세포 및 치주인대 세포에서 MMP-3과 -9의 발현을 억제하였으며 이는 인도메타신 투여로 치아 맹출이 억제될 수 있음을 시사한다.

## 참 고 문 헌

- Marks SC Jr. The basic and applied biology of tooth eruption. *Connect Tissue Res* 1995;32:149-57.
- Cahill DR, Marks SC Jr. Tooth eruption: Evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol* 1980;9:189-200.
- Wise GE, Lin F. The molecular biology of initiation of tooth eruption. *J Dent Res* 1995;74:303-6.
- Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal Hansen H, et al. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. *Eur J Oral Sci* 2002;110:445-51.
- MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, Shigeyama Y, Somerman MJ. Expression of type I and II collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. *Arch Oral Biol* 1998;43:779-87.
- 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.
- Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* 2000;291:223-34.
- Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998;273:32347-52.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: Association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-45.
- Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. Interleukin-1 $\alpha$ -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. *J Dent Res* 2000;79:1423-30.
- Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res* 1995;74:1226-34.
- Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81:603-7.
- Yoshihara N, Yoshihara K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, et al. Temporospatial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn* 2003;228:105-12.
- Caron C, Xue J, Bartlett JD. Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. *Matrix Biol* 1998;17:501-11.
- Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinase A and B during mouse tooth morphogenesis. *Eur J Oral Sci* 1999;107:121-30.
- Grier RL 4th, Wise GF. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res* 1998;77:8-15.
- Bartlett JD, Zhou Z, Skobe Z, Dobeck JM, Tryggvason K. Delayed tooth eruption in membrane type-1 matrix metalloproteinase deficient mice. *Connect Tissue Res* 2003;44:300-4.
- Kyrkanides S, O'Banion MK, Subtelny JD. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: Metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000;118:203-9.
- Blavier L, Delaisse JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci* 1995;108:3649-59.
- Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* 2000;151:879-89.
- Everts V, Delaisse JM, Korper W, Niehof A, Vaes G, Beertsen W. Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol* 1992;150:221-31.
- Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 2000;79:1969-77.
- Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res* 1997;46:310-9.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;93:411-22.
- Linsuwanont B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein during deciduous tooth resorption in bovine odontoclasts. *Bone* 2002;31:472-8.
- Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation: Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:17124-31.
- Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP. Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts: Dissociable control of two metalloproteinases by interferon- $\gamma$ . *J Biol Chem* 1991;266:23477-82.
- Goldhaber P, Rabadjija L, Beyer WR, Kornhauser A. Bone resorption in tissue culture and its relevance to periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1973;87:1027-33.
- Czuszak CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E2 potentiates interleukin-1 induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1996;23:635-40.
- Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993;64:432-44.
- Takigawa M, Takashiba S, Takahashi K, Arai H, Kurihara H, Murayama Y. Prostaglandin E2 inhibits interleukin-6 release but not its transcription in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 $\beta$  or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Periodontol* 1994;65:1122-7.
- Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res* 1995;313:36-46.
- Nukaga J, Kobayashi M, Shinki T, Song H, Takada T, Takiguchi T, et al. Regulatory effects of interleukin-1 $\beta$  and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2004;75:249-59.
- Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E2 is a main mediator in receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*,

- Treponema denticola, and Treponema socranskii. J Periodontol 2005;76:813-20.
35. Noguchi K, Shitashige M, Ishikawa I. Involvement of cyclooxygenase -2 in interleukin-1 $\alpha$ -induced prostaglandin production by human periodontal ligament cells. J Periodontol 1999;70:902-8.
  36. Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, Bosca L, Martin-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. Hepatology 2001;33:860-7.
  37. Oh JS, Sim WJ, Cha SJ, Chi KC, Park SJ, Lim HM, et al. The effect of COX-2 inhibitor on the growth and metastasis of gastric cancer xenograft. J Korean Surg Soc 2002;62:95-102.
  38. Everts V, Korper W, Jansen DC, Steinfors J, Lammerse I, Heera S, et al. Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvarial bone but not in resorption of long bone. FASEB J 1999;13:1219-30.
  39. 이지현, 신종철, 안현영, 양동은, 권인, 이귀세라 등. 배양된 인간 영양배엽세포주에서 세균내독소에 의한 MMP-2와 MMP-9의 발현에 있어서 COX-2의 역할. 대한산부회지 2002;45:1752-7.
  40. Wahl LM, Olsen CE, Sandberg AL, Mergenhagen SE. Prostaglandin regulation of macrophage collagenase production. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:4955-8.
  41. Wahl LM, Lampel LL. Regulation of human peripheral blood monocyte collagenase by prostaglandins and anti-inflammatory drugs. Cell Immunol 1987;105:411-22.
  42. DenBesten PK, Heffernan LM, Treadwell BV, Awbrey BJ. The presence and possible functions of the matrix metalloproteinase collagenase activator protein in developing enamel matrix. Biochem J 1989;264:917-20.
  43. Ten Cate AR. Oral histology, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Mosby; 1994.

- ORIGINAL ARTICLE -

## The effect of indomethacin on the matrix metalloproteinases in canine permanent tooth eruption

Yoon-Goo Kang, DDS, MSD,<sup>a</sup> Jong-Hyun Nam, DDS, MSD, PhD,<sup>b</sup> Ki-Soo Lee, DDS, MSD, PhD<sup>c</sup>

Tooth eruption requires remodeling of surrounding tissues. This study was aimed to investigate the effect of indomethacin on the dental follicle and paradental tissues during tooth eruption by observing the distribution and expression of MMP by the immunohistochemical method. Ten mongrel dogs of ten to twelve weeks old were divided into 5 groups; four experimental groups administered indomethacin 2 mg/Kg/day and 8 mg/Kg/day orally 2 times a day for 14 days and 7 days respectively, and the control group was administered a placebo. Permanent teeth before eruption and their surrounding tissues were selected and excised. H & E staining and immunohistochemical stainings of MMP-3 and -9 were performed and examined under the light microscope. Osteoclasts, osteoblasts, periodontal ligament cells, ameloblasts and odontoblasts of the control group all expressed MMP-3 and -9. In the experimental group, osteoclasts, osteoblasts and periodontal ligament cells showed reduced expression of MMP-3 and -9. Magnitude of MMP reduction in the experimental group showed a time and dose of indomethacin administration dependent manner. These results show that indomethacin inhibited MMP-3 and -9 expression in the dental follicle and surrounding tissues and suggest that when indomethacin is administered for long periods, tooth eruption could be delayed.

Korean J Orthod 2006;36(2):91-102

※ **Key words:** Indomethacin, Tooth eruption, Matrix metalloproteinase

<sup>a</sup> Graduate Student, <sup>b</sup> Assistant Professor, <sup>c</sup> Professor, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Kyunghee University

Corresponding author: Ki-Soo Lee

Department of Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University, 1 Hoegi-Dong, Dongdaemun-Gu, Seoul 130-702, Korea

+82 2 958 9390

kisslee@khu.ac.kr

Received June 24, 2005; Last Revision October 25, 2005; Accepted October 27, 2005