

Cyclosporine A에 의해 과증식된 조직의 치은섬유아세포에서 MMP-1, TIMP-1, TGF- β 1, FGF-2, 그리고 FGF-7의 mRNA 발현에 관한 연구

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과,

한양대학교 의생명과학연구원²

마평수¹ 이재선^{1,2} 박창주^{1,2} 황경균^{1,2} 심광섭¹

I. 서론

Cyclosporine A(CsA)는 광범위하게 사용되는 면역억제제로, 장기이식환자의 거부반응을 막기 위해 사용되고, 자가 면역질환의 치료에도 사용되고 있다¹⁻³. CsA 투여와 관련된 부작용은 신독성, 간독성, 고혈압, 신경독성, 치은증식이 보고 되었다⁴⁻⁶. 그중 Starzl 등⁵이 CsA 투여와 관련된 치은증식을 이식수술을 받은 환자에서 처음으로 관찰한 후 많은 연구자들이 CsA 투여와 치은증식과의 관련성을 밝히기 위해서 많은 연구를 시도하였다^{6,7}. CsA 투여와 관련된 치은증식의 원인과 확실한 기전을 발견하지 못하고 있지만, 현재는 섬유아세포의 기능 중에서 교원질생성에 관련된 성장인자, 단백질, 교원질분해효소 활성 변화 등이 비정상적인 치은증식과 관련이 있다는 연구 보고가 있다^{8,9}. 이러한 연구 결과들은 상피의 증가를 동반한 치은 섬유아세포의 증가로 세포외기질 부분의 교원질 생성 증가가 비정상적인 치은 증식의 주된 요인이라고 가정하고 있다. 이러한 가설들은 세포외기질 구성물 중 교원질의 생성과 파괴의 균형이 교원질 생성과 축적의 방향으로 이동함에 CsA투여가 관련이 있는 것으로 판단하고 있다.

섬유아세포는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase-1; MMP-1), 특이성 금속단백분해효소 억제인자(tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinase; TIMP-1), type I procollagen, TGF- β 1 (transforming growth factor) 등의 cytokine을 통해서 교원질 대사를 조절한다¹⁰⁻¹⁷.

MMP-1은 아연을 포함하고 있는 세포외 기질 단백질 분해효소로 세포외기질 중에서 세포간질이나 기저막 교원질, 단백질, 파이브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin) 등의 단백질로 구성된 물질을 분해시켜 발육, 성장, 창상의 치유와 같은 결합조직 재형성에 관여한다. MMP-1의 활성은 세포 외부적으로 조절할 수 있는데, 자연적인 억제인자인 TIMP-1과 상호 작용에 의해서 조절 된다⁸. TGF- β 는 창상 치유에 관계되는 많은 세포 활성물질 중에 염증반응과 세포외기질 축적 등 창상 치유의 모든 과정에서 영향을 미치는 인자로서 창상치유 과정에서 많은 교원질을 생산하게 하여 구강 연조직의 재형성에 관여 한다¹⁹.

최근 CsA 투여로 발생하는 비정상적인 치은증식과 관련된 연구로 치은섬유아세포에 의한 교원질 대사의 조절 변화와 달리 치은의 상피 부분의 증식에 관련된 연구들이 보고된다. CsA의 투여가 구강각화상피세포의 수명(life span)을 증가시킴으로 비정상적인 치은증식을 야기할 것이라는 가설로 치은증식의 상피층 증가의 원인을 설명하는 보고도 있다²⁰. 구강 각화상피세포의 증식에 관련된 성장 인자는 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF)의 일곱 번째 구성원인 FGF-7, 즉 섬유아세포에서 생성하는 26-28 kDa의 폴리펩타이드로, 중배엽세포(mesenchymal cell)과 상피세포(epithelial cell)사이에서 상피세포로의 분화와 관련된 신호전달을 조절하는 역할을 한다²¹.

지금까지 CsA에 의한 치은증식에 관하여 섬유아세포에 의한 세포외기질 생성과 분해에 관련된 연구들

이 많이 진행되고 있으나, CsA에 의한 치은증식은 약제에 대한 부작용이라는 관점과 원인이 되는 성장인자의 발견이라는 것에 중점을 두고 연구가 진행되고 있다. 그러나 CsA 투여와 관련된 각화세포의 변화에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구는 CsA의 자극 농도별, 시간별에 따른 MMP-1, TIMP-1, TGF- β , FGF-2, 그리고 FGF-7의 mRNA 발현을 관찰하여 CsA와 관련된 치은증식의 기전 및 양상과 구강각화세포와의 관련성을 알아보고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구대상

본 연구를 위한 치은섬유아세포는 한양대학교병원에서 신장이식수술을 시행한 후 신장내과에서 CsA를 투여 받고 있는 환자 중에서 비정상적인 치은증식으로 치과에 내원한 환자 3명의 치은 절제술로 얻은 치은 조직과 면역억제제를 복용하고 있지 않은 건강한 성인 3명의 제 3 대구치 발치 시 얻은 정상 치은 조직을 배양하여 사용하였다. 치은 조직 채취와 조직의 사용에 대한 환자의 동의를 받았고, 실험에 대한 연구 방법 및 내용은 한양대학교 병원 임상시험심사위원회의 허가를 받았다.

2. 연구방법

1) 조직 채취와 세포 배양 : 실험에 사용된 치은섬유아세포는 채취된 정상 및 증식 환자의 치은 조직을 다음과 같은 방법으로 배양해서 얻었다. 채취된 치은 조직을 PBS (phosphate-buffered saline: Gibco, Grand Island, NY, USA)에 여러 번 세척 한 다음 4°C의 dispase II 용액 (Roche, Mannheim, Germany)에 20 시간 담가두었다. 각화 상피 층을 분리한 후 남은 결합조직을 잘게 잘랐다. 잘게 자른 후에 생긴 덩어리 부유물을 모은 후 원심 분리하여 세포덩어리를 모았다. 얻어진 세포덩어리를 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco)를 포함한 DMEM (Dulbeco's

Modified Eagle's Medium, Gibco)에서 배양하였다. 배양 4일 부터 치은섬유아세포가 증식하기 시작하였다. 각 계대(passages)별로 세포의 수와 활성을 평가하기 위해서 trypan blue 염색을 시행하였다. 실험은 4, 5계대의 치은섬유아세포를 사용하였다(Fig. 1).

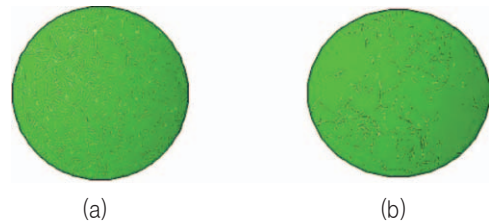


Fig. 1. Gingival fibroblasts were obtained by incubating from the normal(a) and overgrown gingival tissues(b).

2) CsA의 처리 : 치은 섬유아세포는 6 well의 배양접시에 1×10^4 cells/well의 세포가 증식할 때에 자극을 시작하였다. CsA 자극 농도(ng/ml)는 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml 로 각각을 24, 48, 72 시간 동안 처리하였다.

3) mRNA 추출 : mRNA를 추출하기 위해서 먼저, CsA를 각 농도로 처리된 세포배양 well의 상등액을 걷어내고, Easy Blue™ (Intron, Seong Nam, Korea)를 1 ml/well 씩 tube에 넣고 재부유시킨 다음, chloroform 200 μ l를 첨가 하여 세게 흔들고 난 뒤 13000 rpm, 15분간 4°C에서 원심분리 하였다. 상층에서 400 μ l를 취하여 새 튜브에 옮겨 넣고 여기에 isopropanol을 동량 넣어 mRNA를 침전시켰다. 실온에서 10분간 방치한 다음 13000 rpm으로, 5분간 4°C에서 원심분리한 뒤 상등액을 걷어내고, 마지막으로 75% 에탄올을 넣어 10000 rpm으로, 5분간 4°C에서 원심 분리하여 상등액을 버리고 mRNA를 얻었다.

4) Reverse transcriptase-polymerase chain Reaction (RT-PCR) : 추출된 mRNA를 cDNA로 변환시키기 위해서 mRNA를 70°C의 0.5 μ g random nonamer (Genotech, Dae Jeon, Korea)에서 5분 동안 반응시킨 후 4°C에서 냉각시켰다. RNA-nonamer를 10 mM dNTP mix (iNtRON Corp., Seoul, Korea) 1 μ l, reverse transcriptase M-MuLV (MBI, Fermentas, Hanover, MD, USA) 1 unit, 5X M-MuLV dilution buffer (MBI, USA) 4 μ l, and RNase inhibitor (MBI) 0.5 μ l과 mix하고 20 μ l가 되도록 nuclease-free water (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 조절하였다. 이 혼합물을 25°C에서 10 min, 42°C에서 60 min, 72°C에서 10 min, 4°C에서 5 min으로 배양 하였다. PCR은 1 μ l의 cDNA에 2.5 mM dNTP mix (iNtRON Corp) 2 μ l, 10X Taq buffer (Intron) 2 μ l, Taq polymerase (iNtRON Corp) 0.2 μ l, 10 pmol 각 유전자에 맞는 forward 및 reverse primers (Genotech, Dae Jeon, Korea)를 사용하여 시행하였다. GAPDH, MMP-1, TIMP-1, TGF- β 1, FGF-2와 FGF-7의 cDNA는 각각의 specific primer쌍을 사용하였다. 정확한 mRNA 양을 측정하기 위해서 GAPDH 발현을 관찰하였다. 사용된 각각의 primer들은 Table. 1과 같다. PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 5 μ l씩 취하여 6X loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 3.0% glycerol in water) 1 μ l와 혼합하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide (Sigma, St. Louis, USA)로 염색하여 Gel-Doc (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에서 분석하였다. 각각의 샘플에서 나온 target mRNA transcripts의 band intensity는 GAPDH band intensity의 상대적인 비율로 계산하였다.

Table 1. The sequences of used primers and the condition of RT-PCR.

Primers	sequence (5' → 3')	Condition	cycle	size
MMP-1-FW	GGT GAT GAA GCA GCC CAG	95°C 3 min 95°C 30 sec 58°C 30 sec	30	438bp
MMP-1-RV	CAG TAG AAT GGG AGA GTC	72°C 30 sec 72°C 2 min 4°C ∞		
TIMP-1-FW	TGC ACC TGT GTC CCA CCC CAC CCA CAG ACG	94°C 3 min 93°C 45 sec 58°C 45 sec	34	551bp
TIMP-1-RV	GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG CCA GGT	72°C 90 sec 72°C 7 min 4°C ∞		
TGF- β FW	AAG TGG ATC CAC GAG CCC AA	94°C 3 min 94°C 30 sec 55°C 60 sec	31	246bp
TGF- β RV	GCT GCA CTT GCA GGG GCG CAC	72°C 30 sec 72°C 7 min 4°C ∞		
FGF-2-FW	TCT AGG TAA GCT TCA CTG G	94°C 5 min 94°C 60 sec 55°C 60 sec	27	480bp
FGF-2-RV	AGT GTG TGC TAA CCG TTA C	72°C 60 sec 72°C 7 min 4°C ∞		
FGF-7-FW	TCT GTC GAA CAC AGT GGT ACC T	94°C 3 min 94°C 30 sec 60°C 30 sec	28	266bp
FGF-7-RV	GTG TGT CCA TTT AGT TGA TGC AT	72°C 30 sec 72°C 7 min 4°C ∞		
GAPDH-FW	GAA GTG GAA GGT CGG AGT C	94°C 3 min 94°C 30 sec 57°C 30 sec	25	313bp
GAPDH-RV	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	72°C 30 sec 72°C 7 min 4°C ∞		

PCR; Polymerase chain reaction, MMP; Matrix metalloproteinase, TIMP; Tissue specific inhibitor of matrix metalloproteinase, TGF; Transforming growth factor, FGF; Fibroblast growth factor, GAPDH; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, FW; Forward, RV; Reverse bp; Base pair.

III. 연구 결과

1. CsA 자극 시간 증가와 MMP-1의 발현 변화

CsA의 자극시간 증가에 따른 MMP-1 mRNA의 발현 변화를 관찰하기 위해서 정상 및 증식환자에서 배양된 치은 섬유아세포에 CsA를 농도 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml로 24, 48, 72시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 후 MMP-1의 mRNA의 발현 양상을 보기 위해서 RT-PCR을 각각 시행하였다. MMP-1의 mRNA 발현은 438bp에서 관찰되었다. 24시간 CsA를 자극한 실험에서는 증식 치은 섬유아세포에서는 농도에 따른 소량의 감소를 관찰할 수 있었고, 정상 치은 섬유아세포에서 CsA 농도에 따른 MMP-1 발현 양의 변화를 관찰할 수 없었다. 48시간 CsA를 자극한 실험에서는 두 군에서 농도에 따른 발현의 감소를 관찰할 수 있었다. 72시간 CsA를 자극한 경우에는 증식 치은 섬유아세포에서는 농도에 따른 발현의 변화가 불규칙하여 판단하기는 어려우나 전체적인 경향은 농도에 따른 증가를 관찰할 수 있었고, 정상 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도에 따른 MMP-1 발현은 750-1000 ng/ml에서는 감소하는 경향을 보이나, 전체적으로는 변화가 없음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

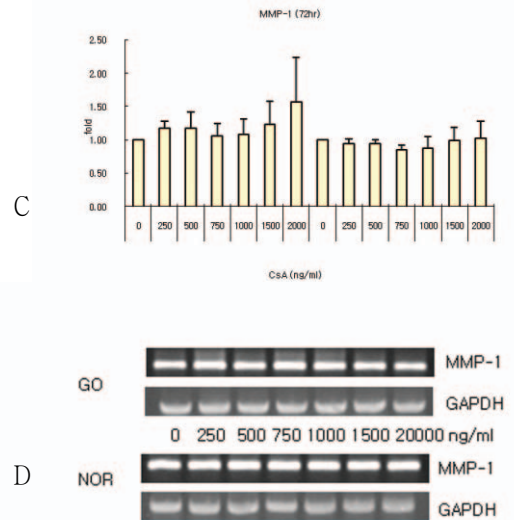
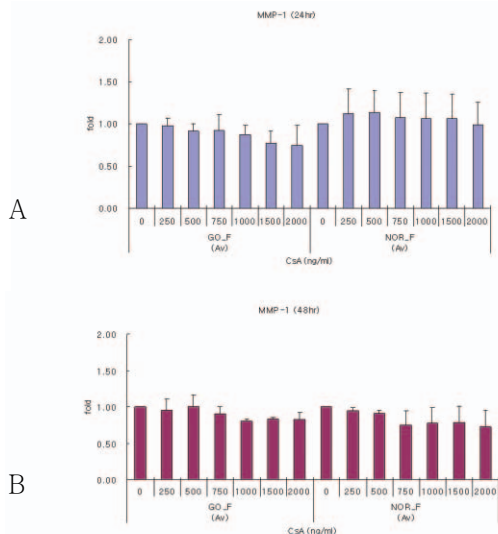


Fig. 2. Effect of CsA on production of MMP-1 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to MMP-1 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain (A: CsA Stimulation for 24 hrs on gingival fibroblast, B: CsA Stimulation CsA for 48 hrs, C : CsA Stimulation for 72 hrs, D : The mRNA expression of MMP-1 on gingival fibroblast for 24 hrs stimulation, GO : Gingival Overgrowth, NOR : Normal, F : Fibroblast)

2. CsA 자극 시간 증가와 TIMP-1의 발현 변화

CsA의 자극시간 증가에 따른 TIMP-1 mRNA의 발현 변화를 관찰하기 위해서 정상 및 증식환자에서 배양된 치은 섬유아세포에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml로 24, 48, 72시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 후 TIMP-1의 mRNA 발현 양상을 관찰하기 위해서 RT-PCR을 시행하였다. TIMP-1의 mRNA 발현은 551bp에서 관찰되었다. CsA를 24시간 자극한 실험에서는 CsA의 농도가 증가함에 따라서 정상 및 증식 치은 섬유아세포 모두에서 TIMP-1의 발현은 감소하는 경향을 보였다. CsA를 48시간 자극한 실험에서는 증식 치은 섬유아세포에는 250, 500 ng/ml에서는 증가하는 경향

을 보이지만, 전체적으로는 발현 양의 변화는 관찰되지 않았다. 정상 치은 섬유아세포는 500, 750 ng/ml에서 감소하는 경향을 보이지만, 전체적으로는 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 72시간 CsA를 자극한 실험에서는 증식 치은 섬유아세포에서는 2000 ng/ml에서 감소가 관찰되고, 정상 치은 섬유아세포에서도 농도 증가에 따른 감소가 있지만, 전체적으로는 자극 시간에 따른 TIMP-1의 발현 변화는 관찰되지 않는 것으로 판단되었다(Fig. 3).

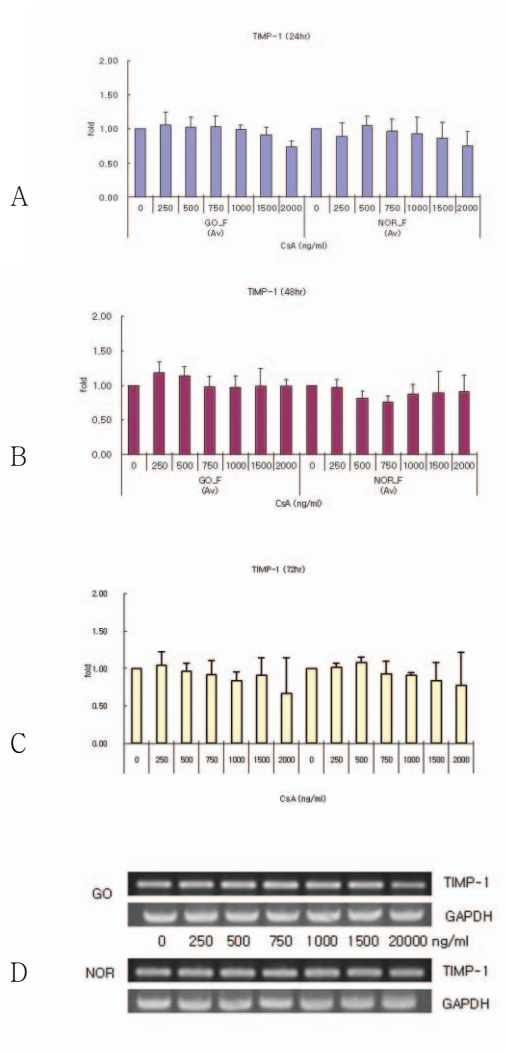
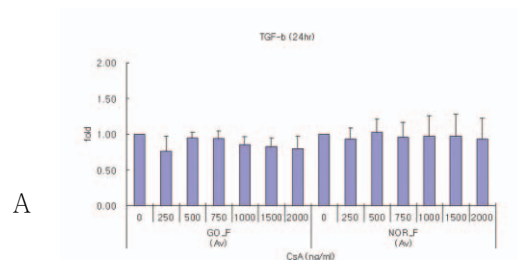


Fig. 3. Effect of CsA on production of TIMP-1 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to TIMP-1 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain (A: Stimulated CsA for 24 hrs on gingival fibroblast, B: CsA Stimulation CsA for 48 hrs, C: CsA Stimulation for 72 hrs, D: The mRNA expression of TIMP-1 on gingival fibroblast for 24 hrs stimulation, GO: Gingival Overgrowth, NOR: Normal, F: Fibroblast)

3. CsA 자극 시간 증가와 TGF- β 의 발현 변화

CsA의 자극시간 증가에 따른 TGF- β mRNA의 발현 변화를 관찰하기 위해서 정상 및 증식환자에서 배양된 치은 섬유아세포에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml로 24, 48, 72시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 다음 TGF- β mRNA의 발현을 보기 위해서 RT-PCR을 시행하였다. TGF- β 의 mRNA 발현은 246bp에서 관찰되었다. CsA를 24시간 자극한 실험에서는 증식 치은 섬유아세포에서는 250 ng/ml에서 일시적으로 감소가 관찰되나, 전체적인 농도 변화에서는 발현의 변화를 관찰할 수 없었다. 정상 치은 섬유아세포에서도 발현의 변화는 관찰할 수 없었다. CsA를 48시간 자극한 실험에서는 증식 및 정상 치은 섬유아세포에서 농도 증가에 따른 TGF- β mRNA 발현의 감소를 관찰할 수 있었다. 72시간 동안 CsA를 자극한 실험에서는 정상 및 증식 치은 섬유아세포에서 TGF- β mRNA 발현의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 4).



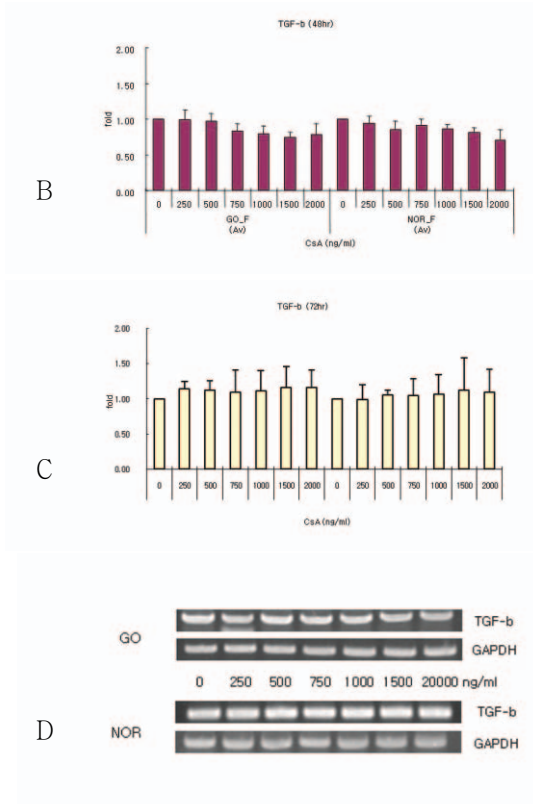


Fig. 4. Effect of CsA on production of TGF- β 1 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to TGF- β 1 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain (A: CsA Stimulation for 24 hrs on gingival fibroblast, B: CsA Stimulation for 48 hrs, C : CsA Stimulation CsA for 72 hrs, D : The mRNA expression of TGF- β 1 on gingival fibroblast, GO : Gingival Overgrowth, NOR : Normal, F : Fibroblast)

4. CsA 자극 시간 증가와 FGF-2의 발현 변화

CsA의 자극시간 증가에 따른 FGF-2 mRNA의 발현 변화를 관찰하기 위해서 정상 및 증식환자에서 배양된 치은 섬유아세포에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml로 24, 48, 72시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 다음 FGF-2의 발현을 보기 위해서 RT-PCR을 각각 시행하였다. FGF-2의 mRNA 발현은 480bp에서 관찰되었다.

CsA를 24시간 동안 자극한 실험에서는 정상 및 증

식 치은섬유아세포에서는 FGF-2 mRNA 발현의 변화를 관찰할 수 없었지만, CsA를 48시간, 72시간 동안 CsA를 자극한 실험에서는 CsA 농도의 증가에 따른 FGF-2 mRNA 발현의 증가를 관찰되었고, 발현 양의 증가는 48시간 보다는 72시간 자극한 실험에서 증가 폭이 크게 관찰되었다(Fig. 5).

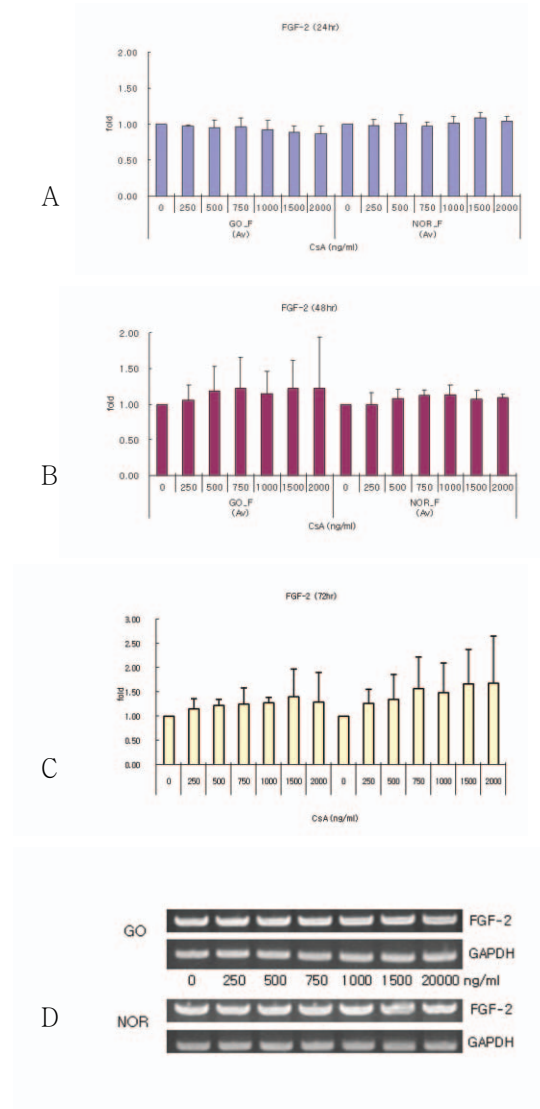


Fig. 5. Effect of CsA on production of FGF-2 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to FGF-2 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain (A: CsA stimulation for 24 hrs on gingival fibroblast, B: CsA stimulation CsA for 48 hrs, C : CsA stimulated for 72 hrs, D : The mRNA expression of FGF-2 on gingival fibroblast for 24 hrs stimulation, GO : Gingival Overgrowth, NOR : Normal, F : Fibroblast).

5. CsA 자극 시간 증가와 FGF-7의 발현 변화

CsA의 자극시간 증가에 따른 FGF-7 mRNA의 발현 변화를 관찰하기 위해서 정상 및 증식환자에서 배양된 치은 섬유아세포에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml로 24, 48, 72시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 다음 FGF-7의 발현을 보기 위해서 RT-PCR을 각각 시행하였다. FGF-7의 mRNA 발현은 266bp에서 관찰되었다.

CsA를 24시간 자극한 군에서 증식 및 정상 치은 섬유아세포에서 FGF-7 mRNA 발현의 변화를 관찰할 수 없었지만, CsA를 48시간, 72시간 CsA를 자극한 실험에서는 CsA 농도의 증가에 따른 FGF-7 mRNA 발현의 감소를 관찰할 수 있었고, 감소의 양상은 48시간의 자극 실험에서 잘 관찰되었다(Fig. 6).

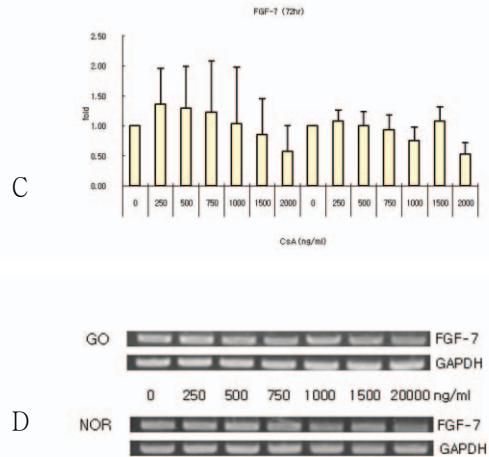
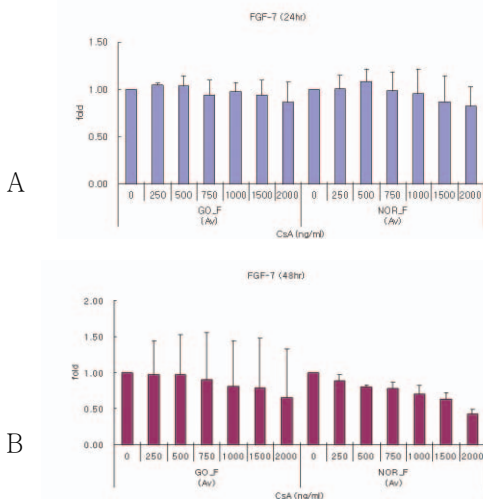


Fig. 6. Effect of CsA on production of FGF-7 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to FGF-7 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain (A: CsA Stimulation for 24 hrs on gingival fibroblast, B: CsA stimulation CsA for 48 hrs, C : CsA stimulation for 72 hrs, D : The mRNA expression of FGF-7 on gingival fibroblast for 24 hrs stimulation, GO : Gingival Overgrowth, NOR : Normal, F : Fibroblast)

IV. 총괄 및 고찰

CsA는 장기이식환자에게 많이 사용되는 면역억제제로 자가 면역질환의 치료 등에도 많이 사용되고 있다. 장기간 CsA 사용은 신장독성, 간독성, 신경독성 등의 전신적 합병증과 구강 내 비정상적인 치은조직의 증식을 야기한다. 치주조직의 염증의 일반적인 반응인 치은 증식은 CsA, phenytoin, nifedipine 등의 약물의 부작용으로 발생하기도 한다²²⁾. 이 중에서 CsA에 의한 치은 증식은 1983년⁶⁾ 사람에서 보고된 이후 발생의 기전, 원인, 발생양상에 대한 많은 연구들이 진행되었다. 하지만, CsA에 의한 치은의 비정상적인 증식의 확실한 기전은 아직도 규명되지 않았다. 그리고, CsA에 의한 치은증식의 임상적 양상 중에서 발생 빈도는 CsA를 투여 받는 전체환자에서 나타나는 것



이 아니라, 투여환자의 25-80%에서 관찰되는 것으로 보아서 CsA 투여와의 관련성에 환자의 유전적인 경향도 있는 것으로 보여진다²³⁾. 이러한 CsA에 의한 치은비대에 대한 치료도 정확하게 확립이 되어 있지 않은 실정이다. 임상 연구결과에 의하면 외과적 절제 또는 약물치료 후 일정 기간 경과 후 재발에 대한 보고를 보면, 외과적 절제 후 50%이상이 재발된다고 보고도 있다²⁴⁾. Azithromycin이라는 약물을 이용하여 다양한 세포들에서 분비되는 cytokine을 조절하여 교원질 합성을 방해하는 방법으로 치은 증식으로 조절을 시도하였으나, 치은 증식을 완전히 해결하지 못하였다²⁵⁾. CsA에 의한 치은증식의 원인은 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 이는 한가지의 요인에 의해서 야기되기 보다는 구강내의 여러 환경 변화에 의한 것으로 보는 견해들이 많다. 환자의 나이나 성별에 따른 호르몬의 변화, 치주조직의 염증반응에 따른 다양한 변화, 치주조직을 이루고 있는 여러 세포들과 이들 세포들을 조절하는 기전이 CsA에 영향을 받았을 경우 여러 조절기전에 의해서 비정상적인 치은 증식이 나타난다고 보고하고 있다¹⁻³⁾. 또한, IL-1 (Interleukin-1)이 IL-2 수용체를 가진 세포독성 T-임파구의 전구체를 활성화시키는 과정에서 IL-2에 의한 세포독성 T-임파구의 활성화가 이식의 거부반응을 야기하는 과정에서 CsA의 영향에 의해서 비정상적인 치은 증식이 야기될 것이라고 주장하였다²²⁾. Leukotriene B4는 염증반응 중 세포막에서 유래되는 매개체로서 섬유아세포의 활성화와 결합조직의 생성과 파괴를 조절, interferon- γ 와 IL-2를 자극한다. 혈소판 활성화인자는 염증반응과 면역반응에 관여하고 있는데, 섬유아세포의 활성화와 교원질의 증식에 영향을 준다. 또한 혈소판 활성화인자와 leukotriene B4 등이 치주질환에 이환된 치은 열구액에서 발견된다^{26,27)}. 비정상적 치은 증식의 정도는 CsA의 혈장 농도보다는 일반적인 치은염이 많은 영향을 미친다고 보고 한다^{28,29)}. 염증반응을 매개하는 IL-1는 치주염과 관련된 치은 열구액에서 증가하고, 골 흡수를 야기하고, 동시

에 결합조직의 파괴를 유도한다는 보고가 있다³⁰⁾. IL-6 또한 정상치는 보다는 염증이 있는 치은에서 발현이 증가하지만, 과증식된 치은에서는 더 높게 발현된다는 보고가 있다. Chae 등⁹⁾에 의하면 이러한 싸이토카인은 결합조직의 증식 조절에 관련이 되는 데, TGF- β 는 IL-6를 자극시켜서, IL-6이 치은섬유아세포를 증식을 유도한다고 보고하였다.

TGF- β 는 세포증식, 세포 분화, 세포외기질의 중요한 조절인자로 CsA의 자극에 의해서 치은 섬유아세포에서도 발현되는 데, 이러한 TGF- β 의 발현은 섬유아세포 증식과 치은섬유아세포에 의한 교원질 생성도 자극하게 된다. 섬유아세포에서 분비되는 TGF- β 는 자가 분비 형태의 기전에 의한 분해 기능의 저하로 인해서 결합조직에 교원질 축적을 야기함으로 치은증식을 야기한다. 그러므로 antisense에 의한 TGF- β 의 발현 억제 실험은 TGF- β 의 억제에 따른 교원질 분해 효소의 증가를 보여준다^{3,16)}. Gagliano 등¹⁴⁾은 CsA를 처리한 섬유아세포에서 MMP-1 발현 감소와 동시에, TGF- β 의 발현이 증가된다고 보고 하였다. 이러한 연구들의 결과와는 달리 본 연구결과에서는 24시간 CsA 자극 실험에서는 TGF- β 의 발현의 변화가 관찰되지 않았고, 48시간 CsA 자극 실험에서는 TGF- β 의 발현이 농도의 증가에 따라 감소하는 양상이 관찰되었다. 72시간 CsA 자극 실험에서는 TGF- β 의 농도에 따른 증가가 관찰되었다. Yoshida 등¹⁵⁾은 유사한 연구 결과를 제시하는 데, 백서 치은세포의 CsA 자극 실험에서 TGF- β 의 발현 증가를 관찰하고, 이는 교원질 대사의 변화와 교원질 섬유분해 효소의 발현은 TGF- β 의 발현 증가에 기인한다고 하였다. 하지만, 본 연구에서는 72시간의 실험에서만 증가를 보이는 것으로 보아서 CsA의 자극 강도에 따른 TGF- β 발현 양상은 다른 것으로 보이며, 장기간의 CsA에서 치은 증식과 관련된 TGF- β 분비가 있을 것으로 판단된다. TGF- β 와 마찬가지로 섬유아세포에서 분비되는 FGF-2도 섬유아세포를 자극하여 교원질 대사에 변화를 야기하는데, 본 연구에서도 48,

72시간의 CsA 자극한 실험에서 농도의 변화에 따른 FGF-2의 유의한 증가가 관찰되었다. 이러한 결과로 볼 때에 TGF- β 분비에 의한 치은증식 보다는 FGF-2 분비가 CsA의 치은증식에 관련성이 큰 것으로 보이며 이는 저농도에서는 FGF-2가 더 많은 관련성이 있는 것으로 판단된다.

섬유성증식은 섬유아세포에 의한 교원질과 관련 단백질 분비의 증가 또는 교원질 분해효소의 활성화 감소가 주된 원인으로 판단된다. 세포외기질의 생성과 합성은 염증등의 생리학적 조건에 따라 조절되는데, 이에 관여하는 MMP의 기능에 대한 많은 연구들이 진행 중이다. CsA에 의한 섬유아세포의 반응에서도 MMP들의 발현의 변화를 보고하고 있다. MMP의 활성을 조절하는 억제인자로 TIMP의 연구에서 진행되고 있는데, MMP와 TIMP의 발현 양상은 서로 반대되는 경향을 보여 준다. Hyland 등¹⁰⁾은 CsA로 인한 섬유아세포의 MMP-1, TIMP-1의 mRNA 발현 양상에 관한 실험에서 교원질의 증가는 MMP-1의 발현 감소에 따른 교원질 분해의 억제에 의한 것으로 보고하였다. 그러나 Tuter 등¹¹⁾은 CsA에 의한 치은섬유아세포의 반응에서 치은 증식은 TIMP-1에 의한 교원질 분해 효소의 활성의 증가가 MMP-1의 감소 보다 더 많은 관련이 있는 보고를 하였다. Kim 등¹⁷⁾은 정상 치은 조직과 CsA에 의한 비정상 증식이 있는 치은조직에서 관련 단백질의 발현양상을 면역조직화학적 방법에 의해서 분석한 결과 MMP-1의 발현양상에서 정상 및 증식 치은조직 간의 차이는 있으나, TIMP-1의 발현 양상은 정상 및 증식 조직에서 차이가 없음을 보고하였다. 하지만, 본 연구의 결과는 24시간, 48시간의 경우 MMP-1의 발현 양상은 농도에 따라 감소됨을 보였고, 72시간 자극 실험에서는 농도에 따른 변화를 관찰할 수 없었다. TIMP-1의 CsA 자극에 따른 변화를 보면, 자극 시간과 농도에 따른 발현의 변화는 관찰되지 않았다. 본 연구 결과로 볼 때에는 섬유성증식으로 인해서 야기된 치은 증식은 TIMP-1과 관련된 교원질분해효소억제의 조절보다는

MMP-1의 분해효소의 작용의 감소에 의해서 발생된다고 할 수 있고, 이러한 조절기전은 저 농도에서 더 두드러진다고 판단된다.

CsA에 의한 비정상적인 치은 증식의 기전과 관련된 연구들 중에서 상피층이 두터워짐과 상피돌기(rete peg)의 침윤성 증식을 특징적이라고 보고하며, 이러한 연구들은 비정상적인 치은 증식이 치은섬유아세포에 국한된 것이 아니며, 치은상피조직과 이와 관련된 치은각화세포의 관련성을 암시하고 있다^{12,28)}. CsA가 치은각화세포의 세포주기를 빠르게 변화시켜 각화층이 증식된 다거나 각화세포 자체의 비대(hypertrophy)를 유도하여 직접적으로 치은증식을 일으킨다는 보고³¹⁾가 있는 반면, CsA가 치은각화세포에서 항증식 효과(antiproliferative effect)를 가진다는 보고도 있다³²⁾. 최근의 연구에 의하면 치은섬유아세포의 활성화뿐만 아니라 치은상피부분의 증식에 관련성에 대한 보고들이 있는데, CsA가 구강각화상피의 수명을 증가시킴으로 치은증식에 영향을 준다고 보고하고 있다²⁰⁾. 구강각화상피의 증식에 관련된 성장 인자인 FGF-7은 각화상피세포의 증식에 영향을 준다는 의미에서 KGF (keratinocyte growth factor)로도 명명된다²¹⁾. Das 등³³⁾은 CsA에 의해서 증식된 치은조직에서 KGF의 발현이 증가됨을 관찰하고, KGF가 CsA의 치은각화세포 증식에도 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였지만, Lauer 등³⁴⁾의 연구결과를 보면, 저농도의 CsA는 인간의 치은각화세포의 성장을 자극하지만, 고농도의 CsA는 오히려 치은각화세포의 성장을 억제하는 것으로 보고하고 있다. 본 연구 결과에 의하면, 48시간과 72시간 CsA로 자극한 실험에서 CsA의 농도 증가에 따른 FGF-7의 발현은 유의한 감소를 보이는데 이는 치은섬유아세포에 대한 CsA의 반응은 치은각화세포의 증식을 억제하는 방향으로 조절되는 것으로 생각된다. 이에 따른 치은각화세포에서 CsA에 의한 교원질 대사에 관련된 성장인자와 세포분열의 주기를 조절하는 성장인자들 사이의 관련성에 대한 연구는 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

V. 결론

CsA를 복용하고 있는 환자의 치은조직에서 배양된 구강 섬유아세포와 정상 치은조직에서 배양된 구강 섬유아세포에서 24시간, 48시간, 72시간 동안으로 CsA를 자극한 후 MMP-1, TIMP-1, TGF- β , FGF-2 그리고 FGF-7의 mRNA 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

MMP-1의 발현은 24시간, 48시간 자극실험에서 감소되는 경향을 보였고, TIMP-1의 발현은 모든 시간에서 변화가 없었다. TGF- β 은 72시간 자극에서, FGF-2는 48, 72시간의 자극에서 농도에 따른 증가가 관찰되었다. FGF-7은 48, 72시간의 자극에서 농도에 따른 감소를 관찰할 수 있었다.

상기 결과로 볼 때, CsA와 관련된 비정상적인 치은 증식에서 교원질 대사와 관련된 MMP-1, TGF- β , FGF-2는 증식에 영향을 주는 것으로 판단되며, FGF-7의 감소는 CsA에 의한 각화세포의 증식의 조절에 관련이 있는 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM : Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. *Quintessence Int* 1999; 30: 775-83.
2. Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS : The pathogenesis of drug induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 165-75.
3. Seymour RA, Jacobs DJ : Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol* 1992; 19 :1-11.
4. David-Neto E, Lemos FB, Furusawa EA, Schwartzman BS, Cavalcante JS, Yagyu EM et. al. : Impact of cyclosporin A pharmacokinetics on the presence on side effects in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 343-9.
5. Starzl TE, Weil R 3rd, Iwatsuki S, Klintmalm G, Schroter GP, Koep LJ et al. : The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1980; 151: 17-26.
6. Ryffel B, Donatsch P, Madorin M, Matter BE, Ruttimann G, Schon H et al. : Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch Toxicol* 1983; 53: 107-41.
7. Rateitschak-pluss EM, Hefti A, Lortscher R, Thiel G : Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 237-46.
8. Brown RS, Beaver WT, Bottomley WK : On the mechanism of drug- induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 201-9.
9. Chae HJ, Ha MS, Yun DH, Pae HO, Chung HT, Chae SW et al. : Mechanism of cyclosporine-induced overgrowth in gingiva. *J Dent Res* 2006; 85: 515-9.
10. Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT, Marley JJ, Linden GJ, Winter P et al. : The effects of cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2003; 74: 437-45.
11. Tuter G, Serdar MA, Yalim M, Gurhan IS, Balo? K : Evaluation of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in gingival fibroblasts of cyclosporin A-treated patients. *J Periodontol* 2002; 73: 1273-8.
12. Kim YJ, Hwang KG, Oh Y, Paik SS, Shim KS et al. : The growth factors expression of cyclosporin induced gingival overgrowth. *J Kor Maxillofac Plast Recons Sur* 2005; 27: 438-43.
13. Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD : Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of

- transforming growth factor- β 1. *J Periodontol* 2003; 74: 1625-33.
14. Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C, Torri C, Stabellini G, Ferrario VF et al. : Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 231-8.
15. Yoshida T, Nagata J, Yamane A : Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodontol Res* 2005; 40: 11-9.
16. Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD: Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblast is regulated by transforming growth factor (TGF)- β 1 autocrine stimulation. *J Periodontol* 2002; 73: 1313-22.
17. Kim YM, Hwang KG, JS Lee, Park CJ, Shim KS: The mRNA expression of growth factors in fibroblast from gingival hyperplasia induced by cyclosporin A. *J Kor Maxillofac Plast Recons Sur* 2006; 28: 445-453.
18. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-73.
19. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF : Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 42: 1350-8.
20. Birraux J, Kirby JA, Thomason JM, Taylor JJ : The effect of cyclosporin on cell division and apoptosis in human oral keratinocytes. *J Periodontol Res* 2006; 41: 297-302.
21. Werner S : Keratinocyte growth factor: an unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 153-65.
22. Brown RS, Beaver WT, Bottomley WK : On the mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 201-9.
23. Linden GJ, Haworth SE, Maxwell AP, Poulton KV, Dyer PA, Middleton D et al. : The influence of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. *J Periodontol* 2001; 72: 808-14.
24. Wirnsberger GH, Pfragner R, Mauric A, Mauric A, Zach R, Bogiatzis A, Holzer H : Effect of antibiotic treatment with azithromycin on cyclosporin A-induced gingival hyperplasia among renal transplant recipient. *Transplant Proc* 1998; 30: 2117-9.
25. Citterio F, Di Pinto A, Borzi MT, Scata MC, Foco M, Pozzetto U et al. : Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transrecipients is effective and safe. *Transplant Proc* 2001; 33: 2134-5.
26. Emingil G, Coker I, Atilla G, Huseyinov A : Levels of leukotriene B4 and platelet activating factor in gingival crevicular fluid in renal transplant patients receiving cyclosporin-A. *J Periodontol* 2000; 71: 50-7.
27. Majola MP, McFadyen ML, Connolly C, Nair YP, Govender M, Laher MH : Related factors influencing phenytoin-induced gingival enlargement. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 506-12.
28. Pisanty S, Rahamim E, Ben-Ezra D, Shoshan S : Prolonged systemic administration of cyclosporin A affects gingival epithelium. *J Periodontol* 1990; 61: 138-41.
29. Pisanty S, Shoshan S, Chajek T et al. : The effect of cyclosporin A (CsA) treatment on

gingival tissue of patients with Behcet's disease. *J Periodontol* 1988; 59: 599–603.

30. Myrillas TT, Linden GJ, Marley JJ, Irwin CR : Cyclosporin A regulates interleukin-1beta and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1999; 70: 294–300.

31. Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuutila ML : Mast cell subpopulations in gingival overgrowth induced by immunosuppressive and nifedipine medication. *J Periodontol* 2004; 75: 933–8.

32. Esposito C, Fornoni A, Cornacchia F, Bellotti N, Fasoli G, Foschi A et al. : Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 2000; 58: 123–30.

33. Das SJ, Newton HN, Olsen I : Keratinocyte growth factor receptor is up-regulated in cyclosporine A-induced gingival hyperplasia. *J Dent Res* 2002; 81: 683–7.

34. Lauer G, Mai R, Pradel W, Proff P, Gedrange T, Beyer J : Influence of Cyclosporine A on human gingival keratinocytes in vitro. *J Craniomaxillofac Surg* 2006; 34 Suppl 2: 116–22.

Abstract

The mRNA expression of MMP-1, TIMP-1, TGF- β 1, FGF-2 and FGF-7 in gingival fibroblasts induced by cyclosporine A

Pyung-Soo Ma¹, Jae-Seon Lee^{1,2}, Chang-Joo Park^{1,2},
Kyung-Gyun Hwang^{1,2}, Kwang-Sub Shim¹

¹Department of Dentistry/Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hanyang University

²Institute of Biomedical Science (IBS), Hanyang University

Purpose : Cyclosporine A (CsA) is a widely used immunosuppressive agent with development of gingival overgrowth as a side effect. The mechanisms underlying this immunosuppressive activity are not fully understood. The progression of gingival overgrowth results from the accumulation of extracellular matrix. The purpose of this study was to investigate the mRNA expression of several growth factors associated with CsA according to the induction time and dose.

Materials & Methods : Gingival fibroblasts were obtained from gingival tissues of healthy donor and the patients treated with CsA. The cultured gingival fibroblasts were incubated with increasing concentration(0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml) of CsA for 24, 48, and 72 hours, and the expression of MMP-1, TIMP-1, TGF- β 1, FGF-2 and FGF-7 was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results : The expression of MMP-1 was slightly decreased according to the concentration of treated CsA in 24 and 48 hours stimulation. There was no change in TIMP-1 expression. TGF- β 1 showed the increased expression in 72 hours stimulation and FGF-2 expression was increased in 48 and 72 hours stimulation. The FGF-7 expression was significantly decreased in 48 and 72 hours stimulation.

Conclusions : We concluded that the gingival overgrowth might be related with TGF- β 1, MMP-1 and FGF-2 expression associated with collagen metabolism. And the FGF-7 associated with keratinocyte growth was significantly related with CsA gingival overgrowth. We also speculated that there was no cellular change associated with CsA induction in gingival fibroblast.