

Diphenylhydantoin, retinoic acid 및 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포 활성에 미치는 영향에 관한 연구

원광대학교 치과대학 치주과학교실
김태경 · 김영옥 · 유형근 · 신형식

I. 서 론

달란틴(Sodium phenytoin)¹⁾, Nifedipine²⁻⁵⁾과 cyclosporin⁶⁾ 등의 약물복용에 의하여 발생하는 비염증성 치은비대는 국소적인 자극인자의 유무에 관계 없이 발생하는데, 특히 달란틴에 의하여 유발되는 심한 비염증성 치은비대는 남여공히 발현빈도가 50% 정도로 나타났다⁷⁻⁸⁾. 이러한 증식은 섬유모세포와 관련되어 나타나는 병소로 교원질의 표현형 및 hydroxylation의 변화없이⁹⁾, 성장조절의 결합¹⁰⁾에 의한 비활성의 교원질 분해효소의 증가¹¹⁾, 교원질분해의 감소¹²⁾ 및 비교원성기질의 합성증가에 의한 축적으로 추론되었다¹³⁾.

최근에 Sooriyamoorthy¹⁴⁾은 염증 및 증식을 보이는 치은조직에 5a-dihydrotestosterone(5a-DHT)의 형성이 뚜렷이 증가하고, Southren¹⁵⁾은 이와 더불어 5a-DHT에 대한 치은 수용체가 증가되며, 실험실에서 인체 치은섬유 모세포 배양을 통한 연구에서 5a-DHT의 생합성이 두배까지 증가하는데, Vittek¹⁶⁾과 Tamura¹⁷⁾은 3,4-ketosteroid-alpha A ring reductase enzyme system의 활성화에 관여하는 것으로 주장하였다. 또한, 치은증식은 염증부위¹⁸⁾나 *S. sorbrinus* 6715¹⁹⁾ 존재시 더욱 심하고, 치은절제술 후에 철저한 잇솔질로 감소될 수 있으나 치은용적의 증가는 일어날 수 있음이 관찰되었다.

Dahlloff²⁰⁾은 diphenylhydantoin이 치은조직에 미치는 영향은 T 세포매개에 의한 면역반응과 관련이 있음을 주장하였고, Hassel²¹⁾은 치은섬유모세포 증식의 증대를 보고하였으나 Salo²²⁾에 의한 정상 치

은섬유모세포 배양연구 결과 전체 단백질 및 교원질의 합성은 감소시킨 반면 세포증식에는 영향이 없음을 보고하였으며, Hassel²³⁾은 낮은 활성을 보이는 섬유모세포에서는 세포독성을 보이고 높은 활성을 보이는 세포에는 활성을 높여 기질형성이 증대됨을 작용기전으로 제시하였다.

비타민 A는 라이조솜 효소의 방출을 촉진시켜 라이조솜을 포함하고 있는 세포막에 작용하고²⁴⁾, Sorin과 Roberts²⁵⁾는 비타민 A 유도체인 retinoic acid가 세포의 성장과 분화의 과정을 변조시키는 복합물로 세포표면의 steroid hormone, thyroid hormone과 vitamin D₃ 등의 receptor에 작용하는 것으로 보고하였다. Lawrence²⁶⁾은 소량의 비타민 A는 상피를 위축시키고 과립층에서는 상피세포의 분열을 증가시켜 비후시키며 형성장애(dysplasia)는 보이지 않으나, 상피의 각화가 결여되고, 우등²⁷⁾은 과량의 비타민 A에서는 점막의 화생(metaplasia)을 보이고, 상피세포의 피사를 관찰하였고, Bern²⁸⁾도 점막분비세포에 의하여 편평세포암으로 화생(metaplasia)을 증진시킨다고 하였다. 또한, glycyrrhetic acid는 Abe²⁹⁾과 Mizoguchi³⁰⁾에 의하여 단핵구를 활성화시키는 물질로 interferon(INF) 또는 interleukin-1(IL-1)과 같은 cytokine들의 분비를 촉진시키며, 흉선세포의 분열을 촉진시키고, 종양 promotor에 의하여 유도된 Epstein-Barr virus(EBV)의 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다. 그러나 대부분의 연구가 murine 3T3 및 teratocarcinoma의 F₉과 같은 변형된 세포주에 관한 연구로 배양된 정상세포의 세포활성에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실

정이다²¹⁻²²⁾.

본 연구의 목적은 한국인에서 채취하여 배양한 건강한 치은섬유모세포를 이용하여 세포의 분화와 관련이 있는 retinoic acid 및 glycyrrhetic acid 등이 diphenylhydantoin에 의하여 유발된 세포의 형태 및 세포활성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험에 사용한 5, 5-diphenylhydantoin(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA), retinoic acid(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA)와 glycyrrhetic acid(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA)를 70% ethanol에 용해시켜 3MM filter로 여과하여 4℃에 보관후 사용하였다(Fig 1).

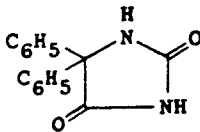
2. 연구방법

1) 치은섬유모세포의 배양

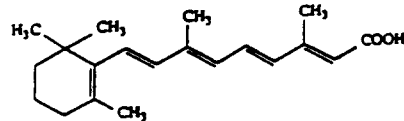
원광대학교 치과대학 부속병원 교정과에 교정치료를 위하여 내원한 10세 전후의 환자 소구치를 발치하면서 발치와 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은을 40% 우태아혈청(fetal bovine serum, GIBCO Co., NY, USA)와 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., NY, USA)를 첨가한 α -MEM(GIBCO Co., NY, USA)에서 3회 세척하였다. 세척한 치은조직을 60mm 세포배양용 Petri dish(Corning Co., NY, USA)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 NO. 15 scalpel 2개를 이용하여 1mm²로 세절하였다.

세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되지 않도록 주의하면서 dish에 잘 퍼 놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37℃, 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Sheldon Manufacturing, Inc. Or. USA)에서 배양하였다. 배양액으로는

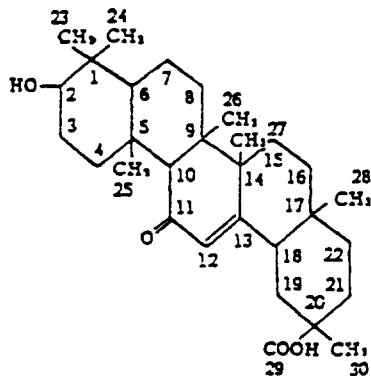
Fig. 1. Structural formula of 5, 5 - diphenylhydantoin, retinoic acid and glycyrrhetic acid



5, 5 - diphenylhydantoin



retinoic acid



glycyrrhetic acid

10% FBS와 1% 항생제를 첨가한 α -MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때까지 삼일 간격으로 교환하였다.

Petri dish 내의 배양액을 제거하고 HBSS(Gibco Co., NY, USA)로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위하여 HBSS를 제거하고, 0.25% Trypsin-EDTA(GIBCO Co., NY USA)를 dish당 2ml씩 넣고, 삼분간 benth 상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 십분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 이회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 분주하였다. 분주 비율은 1:3 내지 1:4로 하고 같은 방법으로 5회 내지 8회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2) Diphenylhydantoin, retinoic acid와 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포모양, 세포수 및 세포활성도에 미치는 영향

10,000개의 세포를 96-well plate의 각 well에 분주하고, 5 μ g/ml과 10 μ g/ml의 diphenylhydantoin 또는 10⁻⁵M, 10⁻⁶M 및 10⁻⁷M의 retinoic acid와 glycyrrhetic acid를 가한 배양액에 2일 배양한 후 세포 형태를 관찰하고, 세포수를 세기위하여 trypsin EDTA로 세포를 떼어낸 후 trypan blue exclusion 법을 이용하여 hemocytometer로 세포수를 세었고, 세포활성을 측정하기 위하여 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., St. Louis, USA)용액 50 μ l를 96-well plate의 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT용액을 버리고, DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시켰다^{33,34)}. Plate를 잘 흔든후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)로 630nm를 기준으로 577nm에서 흡광도를 측정하였다.

매 실험마다 실험요액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 설정하여 모든 실험결과는 아래와 같이 대조군의 백분율로 산출한다.

세포활성도(%) = 실험 well의 흡광도/대조 well의 흡광도 \times 100

3) Retinoic acid와 glycyrrhetic acid가 diphenylhydantoin에 의하여 유도된 치은섬유모세포의 활성화에 미치는 영향

5 μ g/ml과 10 μ g/ml의 diphenylhydantoin에 retinoic acid와 glycyrrhetic acid를 가하여 2일 배양한 후, 세포모양, 세포수 및 세포활성은 MTT방법을 이용하였고 측정은 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)로 630nm를 기준으로 577nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 통계분석

실험 well수는 각 군당 5개씩으로 하였고, 약물의 존재에 따른 각군의 세포생존능력의 평균치와 편차를 구하였으며, 상호간의 차이를 일원변량분석법(ANOVA)으로 분석하였다.

III. 연구결과

1) Diphenylhydantoin, diphenylhydantoin과 retinoic acid, 및 diphenylhydantoin과 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포 형태에 미치는 영향

Diphenylhydantoin 및 glycyrrhetic acid를 가한 경우 정상적인 세포돌기를 보였으나, retinoic acid를 가한 경우에는 diphenylhydantoin 또는 glycyrrhetic acid의 존재와 무관하게 세포돌기의 소실과 둥근 세포로 변화하였다(Fig. 2-6).

2) Diphenylhydantoin, diphenylhydantoin과 retinoic acid, 및 diphenylhydantoin과 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포 증식에 미치는 영향

Diphenylhydantoin은 치은섬유모세포 증식에 대조군과 유의한 차이가 없었고, diphenylhydantoin에 retinoic acid를 가한 경우나 diphenylhydantoin에 glycyrrhetic acid를 가한 경우에도 치은섬유모세포 증식에 영향을 미치지 않았다(Table 1).

3) Diphenylhydantoin이 섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향

Diphenylhydantoin에 의한 세포활성은 10 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 증가되는 경향을 보였다 (P<0.1) (Table 2).

4) Retinoic acid 또는 glycyrrhetic acid가 치은 섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향

10⁻⁵M과 10⁻⁶M의 retinoic acid를 가한 경우 glycyrrhetic acid의 존재와 무관하게 세포활성이 대조

군 및 glycyrrhetic acid만을 가한 군에 비하여 증대되었으나 10⁻⁷M에서는 감소하였다. 한편 glycyrrhetic acid만을 가한 경우의 세포활성은 농도에 무관하게 세포활성을 감소시켰다(Table 3).

5) Diphenylhydantoin과 retinoic acid가 치은 섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향

5 μ g/ml 및 10 μ g/ml의 농도에 diphenylhydantoin에

Table 1. Effect of diphenylhydantoin, retinoic acid, and glycyrrhetic acid on the proliferation of gingival fibroblast (Mean % \pm S. E., n=5)

Proportion of proliferation(%)	
E	100.00 \pm 33.33
D	91.63 \pm 20.64
D+RA	55.56 \pm 20.49
D+GA	55.56 \pm 11.11

D : Diphenylhydantoin E : Ethanol

RA : Retinoic acid

GA : Glycyrrhetic acid

Table 2. Effect of diphenylhydantoin on the cell activity for human gingival fibroblast (Mean % \pm S. E)

E(0.175%) (n=5)	100.00 \pm 37.50
D(5 μ g/ml) + E (n=5)	108.61 \pm 24.65
E(0.34%) (n=5)	100.00 \pm 45.46
D(10 μ g/ml) + E (n=5)	224.40 \pm 51.30*

D : Diphenylhydantoin E : Ethanol

* : P<0.1 significantly different from control

Table 3. Effect of retinoic acid on the cell activity for human gingival fibroblast at second day (Mean % \pm S. E)

Concentration	% change		
	Retinoic acid(RA) (n=5)	Glycyrrhetic acid(GA) (n=5)	RA+GA (n=5)
E	100.00 \pm 42.85	100.00 \pm 42.85	100.00 \pm 42.85
10 ⁻⁵ M	488.28 \pm 33.14 ^a	10.90 \pm 2.00	330.91 \pm 33.08 ^c
E	100.00 \pm 46.94	100.00 \pm 46.94	100.00 \pm 56.78
10 ⁻⁶ M	264.66 \pm 12.28 ^b	22.03 \pm 3.76	137.85 \pm 13.40
E	100.00 \pm 54.49	100.00 \pm 54.49	100.00 \pm 54.50
10 ⁻⁷ M	7.65 \pm 1.33	6.64 \pm 3.09	8.65 \pm 1.67

E : ethanol

a : P<0.05 significantly different from group added 10⁻⁶M and 10⁻⁷M retinoic acid, 10⁻⁵M glycyrrhetic acid, and 10⁻⁵M retinoic acid and glycyrrhetic acid.

b : P<0.05 significantly different from group added 10⁻⁶M glycyrrhetic acid and 10⁻⁶M retinoic acid and glycyrrhetic acid.

c : P<0.05 significantly different from group added 10⁻⁶M and 10⁻⁷M retinoic acid, and glycyrrhetic acid, 10⁻⁵M retinoic acid, and 10⁻⁶M glycyrrhetic acid.

10⁻⁷M의 retinoic acid를 가한 경우의 세포활성은 대조군이나 diphenylhydantoin만을 가한 경우 보다 낮았다(Table 4).

6) Diphenylhydantoin과 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향
5μg/ml 및 10μg/ml의 농도에서 diphenylhydantoin

Table 4. Effect of diphenylhydantoin and retinoic acid on the cell activity for human gingival fibroblast (Mean % ± S. E)

E(0.175%)	100.0± 37.5	E(0.175%)	100.0± 37.5
D(5μg/ml) + E (n=5)	108.6± 24.7	D(10μg/ml) + E (n=5)	224.4± 51.3
E(35.175%)	100.0± 6.1	E(35.175%)	100.0± 29.4
D(5μg/ml) + RA(10 ⁻⁵ M) + E (n=5)	298.7± 31.4	D(10μg/ml) + RA(10 ⁻⁵ M) + E (n=5)	999.9± 333.2
E(3.675%)	100.0± 6.1	E(3.675%)	100.0± 29.4
D(5μg/ml) + RA(10 ⁻⁶ M) + E (n=5)	20.6± 3.1	D(10μg/ml) + RA(10 ⁻⁶ M) + E (n=5)	523.1± 27.0 ^a
E(0.525%)	100.0± 8.6	E(0.69%)	100.0± 13.1
D(5μg/ml) + RA(10 ⁻⁷ M) + E (n=5)	15.2± 3.5 ^b	D(10μg/ml) + RA(10 ⁻⁷ M) + E (n=5)	47.1± 1.6 ^b

D : Diphenylhydantoin

RA : retinoic acid

a : P<0.05 significantly different from group added 10μg/ml diphenylhydantoin 10⁻⁵M.

b : P<0.05 significantly different from group added diphenylhydantoin.

Table 5. Effect of diphenylhydantoin and glycyrrhetic acid on the cell activity for human gingival fibroblast (Mean % ± S. E)

E(0.175%)	100.0± 37.5	E(0.175%)	100.0± 37.5
D(5μg/ml) + E (n=5)	108.6± 24.7 ^a	D(10μg/ml) + E (n=5)	224.4± 51.3 ^b
E(35.175%)	100.0± 6.1	E(35.175%)	100.0± 29.4
D(5μg/ml) + GA(10 ⁻⁵ M) + E (n=5)	39.7± 4.1	D(10μg/ml) + GA(10 ⁻⁵ M) + E (n=5)	61.8± 29.6
E(3.675%)	100.0± 6.1	E(3.675%)	100.0± 29.4
D(5μg/ml) + GA(10 ⁻⁶ M) + E (n=5)	15.1± 1.9	D(10μg/ml) + GA(10 ⁻⁶ M) + E (n=5)	60.8± 12.5
E(0.525%)	100.0± 8.6	E(0.69%)	100.0± 13.1
D(5μg/ml) + GA(10 ⁻⁷ M) + E (n=5)	19.2± 4.6	D(10μg/ml) + GA(10 ⁻⁷ M) + E (n=5)	8.6± 1.5

D : Diphenylhydantoin

GA : glycyrrhetic acid

a : P<0.05 significantly different from group added 10⁻⁶M and 10⁻⁷M glycyrrhetic acid.

b : P<0.05 significantly different from group added glycyrrhetic acid.

toin에 glycyrrhetic acid를 가한 경우의 세포활성은 diphenylhydantoin만을 가한 경우보다 낮았다(Table 5).

IV. 총괄 및 고안

치은비대는 국소적인 원인의 만성염증에 의하여 발생하는 만성 염증성 비대와 딜란틴등의 약을 복용하여 발생하는 비염증성 비대가 있다. 만성 염증성 치은비대는 염증액, 세포삼출액, 상피와 결합조직의 변성, 새로운 모세관의 형성, 혈관의 울혈, 출혈, 상피와 결합조직 및 새로운 교원섬유의 증식이 관찰되고, 풍부한 섬유모세포와 교원질을 포함한 섬유화가 두드러지고 비교적 견고하게 나타나는데, 치태제거와 치태축적을 용이하게 하는 모든 환경인자의 제거로 완치될 수 있다.

간질환자에게 투여하는 약제인 딜란틴 복용으로 발생하는 치은증식은 혈장과 타액내 농도와 관련이 있는 것으로 초기에는 무통성으로 치간유두나 변연 치은에 구슬모양으로 시작하여 점차 치관을 덮게되며 궁극적으로 교합장애를 야기하기도 한다. 염증과 합병되지 않는 한 치은은 단단하고 상실상(Mulberry-shaped)이며 창백한 분홍색의 탄력을 가지고, 출혈 경향도 보이지 않고 가는 선으로 분리됨이 보고되었다. 또한, 딜란틴 치은비대는 국소적 자극유무에 관계없이 발생하며 호발부위는 구강전체에서 발생하나 특히 상하악 전치부에 반발하고 발치와 함께 소실된다. 조직병리학으로 관찰하면 상피와 결합조직의 두드러진 증식과 상피의 극세포증, 상피돌기가 길어져 결합조직 내부에 깊숙히 확산되고, 재발된 치은비대에서는 수많은 모세혈관 섬유모세포와 불규칙한 교원성 섬유가 나타난다¹⁾.

본 연구에서는 섬유모세포의 배양액에 diphenylhydantoin 및 glycyrrhetic acid를 가한 경우는 정상적인 세포돌기를 보였으나, retinoic acid를 가한 경우에는 diphenylhydantoin 또는 glycyrrhetic acid의 존재와 무관하게 세포돌기의 소실과 등근세포로 변화하였는데 이러한 현상은 1978년에 Grippo와 Gudas³⁵⁾ 또한 1989년에 Stoner와 Gudas³⁶⁾가 보고한 retinoic acid가 F₉ 세포내에 존재하는 retinol과 retinoic acid 결합단백질에 영향을 미쳐 세포의 모양에 영향을 미치는 현상이 정상세포에도 존재하는 것으로

생각된다(Fig. 2-6).

또한, 신선하게 배양한 치은섬유모세포의 세포활성이 에탄올에 녹인 diphenylhydantoin에 의하여 증대됨을 관찰할 수 있었고, 배양 2일에 뚜렷한 증가를 관찰할 수 있었다(Table 2). 이러한 세포활성의 증대현상은 표준 세포주에서는 관찰되지 않는 현상으로 건강한 세포만이 이 약물에 대한 수용기가 존재하는 것으로 생각된다. 또한, 이러한 세포활성의 증대는 세포수의 증가없이 나타나는 것으로 Shafer 등³⁷⁾이 보고한 치은섬유모세포의 증식과 관련이 있다는 내용과는 상반되는 결과로 단일세포의 세포활성 증가를 보이는 것으로 생각되는데, 이러한 약제에 의한 효과가 세포증식에 영향을 미치지 않고, mRNA 수준에서의 효과를 생각되고, glycyrrhetic acid의 효과도 이러한 mRNA 수준의 억제효과로 추정된다. 이러한 세포활성의 증가는 증식을 보이는 치은조직에 5a-DHT의 형성이 뚜렷이 증가하고, 이와 더불어 5a-DHT에 대한 치은수용체 증가의 보고¹⁴⁾와 실험실에서 인체 치은섬유모세포 배양을 통한 연구에서 5a-DHT의 생합성이 두배까지 증가한다는 보고¹⁵⁾와 일치하는 것으로 생각된다.

이러한 세포활성의 증대는 phenytoin 투여후 골질의 치유나 발치와의 치유가 촉진된다는 Sklans 등³⁸⁾과 Goebel³⁹⁾의 보고와 일치하는 것으로 생각된다.

비타민 A는 라이조좀 효소의 방출을 촉진시켜 라이조좀을 포함하고 있는 세포막에 작용한다고 보고되었고²⁴⁾, 비타민A 유도체인 retinoic acid는 세포의 성장과 분화의 과정을 변조시키는 복합물로 세포표면의 steroid hormone, thyroid hormone과 vitamine D₃ 등의 receptor에 작용하는 것으로 보고²⁵⁾ 되었으며, Lawrence 등²⁶⁾은 소량의 비타민 A는 상피를 위축시키고 과립층에서는 상피세포의 분열을 증가시켜 비후시키며 이형성은 보이지 않으나 상피의 각화가 결여되고, 우등²⁷⁾은 과량의 비타민 A에서는 점막의 화생을 보이고, 상피세포의 피사를 보고하였고, Bern 등²⁸⁾도 점막분비세포에 의하여 편평세포암으로 화생을 증진시킨다고 보고하였다. 또한 비타민 A는 과량투여시에는 과다증 내지 독성을 보이는 것으로 보고되었는데^{30, 40-44)}, 본 연구에서도 retinoic acid는 10⁻⁷M의 저농도에서 세포활성이 감소되는 양상을 보였다(Table 3).

Glycyrrhetic acid는 단핵구 활성화 시키는 물

질로 interferon(INF) 또는 interleukin-1(IL-1)과 같은 cytokine들의 분비를 촉진시키며, 흉선세포의 분열을 촉진시키고, 종양 promotor에 의하여 유도된 Epstein-barr virus(EBV)의 활성화를 억제하는 것으로 보고^{29,30)} 되었는데, 본 연구에서 10^{-7} M 농도에서도 세포활성을 억제하였다⁴⁵⁻⁵⁰⁾. 이러한 결과는 glycyrrhetic acid가 cortisone의 antigranulomatus 작용을 경쟁적으로 억제한다는 보고와 관련이 있는 것으로 glycyrrhetic acid가 세포의 steroid receptor에 작용하여 세포활성의 감소를 유발하는 것으로 생각되어지는데, 본 연구에서 유발된 diphenylhydantoin에 의하여 세포활성이 억제되는 것은 두약물간에 competition이 존재하여 3,4-Ketosteroid-5-alpha A ring reductase enzyme system의 활성화에 관련이 있는 것으로 생각된다¹⁴⁻¹⁷⁾. 또한, retinoic acid에 의한 세포모양이 glycyrrhetic acid를 첨가하여도 변하지 않는 것은 두 약제 사이에 작용기전이 다른 것과 관련이 있는 것으로 추정되는데, retinoic acid는 steroid receptor에 작용하는 것이 아니라 Grippo와 Gudas³⁵⁾와 Stoner와 Gudas³⁶⁾가 보고한 세포내에 존재하는 특이 intracellular retinol-과 retinoic acid-결합단백을 통하여 일어나기 때문으로 생각된다. 이러한 물질이 5a-DHA와 같은 표적 유전자를 발현시키고, 여기에서 만들어진 5a-DHA가 세포에 존재하는 5a-DHA 수용기를 자극하여 세포활성의 변화를 일으키는 것으로 추정된다. 이러한 현상은 약물간에 길항작용 및 상승작용으로 생각되고, 신선하게 배양한 단일세포에 대한 신호전달 등이 연구가 필요한 것으로 생각되며, 이러한 약제를 이용한 임상연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

Diphenylhydantoin, retinoic acid 및 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향을 관찰하고자 위상차 현미경을 이용한 세포모형 관찰과 MTT를 사용한 세포의 활성을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) Retinoic acid는 diphenylhydantoin 및 glycyrrhetic acid의 존재와 관련없이 치은 섬유모세포를 둥근모양으로 변화시켰다(Fig 2-6).
- 2) Diphenylhydantoin, diphenylhydantoin과 reti-

noic acid, 및 diphenylhydantoin과 glycyrrhetic acid를 가한 경우의 세포증식에서는 치은섬유모세포 증식에는 영향을 미치지 않았다(Table 1).

- 3) Diphenylhydantoin은 치은섬유모세포의 세포활성을 증가시키는 경향을 보였다(Table 2).
- 4) Retinoic acid 및 glycyrrhetic acid는 단독 투여시 치은섬유모세포의 세포활성이 감소하였다(Table 3).
- 5) Glycyrrhetic acid와 retinoic acid는 diphenylhydantoin에 의하여 증대된 세포활성을 감소시켰다(Table 4, 5).

이상의 연구결과, diphenylhydantoin은 치은섬유모세포의 증식에 영향을 미치지 않고 세포활성의 증가를 나타내는 경향을 보이고, retinoic acid 및 glycyrrhetic acid에 의한 세포활성의 소실을 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 치주과학. 치주과학교수협의회. 1992.
2. David L. Harry L. Stephen R. Paul DF. Flushing NY. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. Oral Surg 57 : 620-622, 1984.
3. Nishikawa S. Tada H, Hamasaki A, Kasahara S, Kido J, Nagata T, Ishida H, Wakano Y. Nifedipine-induced gingival hyperplasia : A clinical and vitro study. J Periodontol 62(1) : 30-35, 1991.
4. Romanose GE. Schroter-Kermani C. Herrmann D. Strub JR, Bermmoudin J-P. Extracellular gens in rat oral mucosa, Activation of delta 3,4-ketosteroid-5-alpha A ring reductase enzyme system by 5,5-diphenylhydantoin. J Dent Res 58 : 642-645, 1979.
17. Tamura Y. Study of effects of glycyrrhetic acid and its derivatives on Δ^4 -5 α and 5 β -reductase by rat liver preparations. Folia endocrinol jap 51 : 589-600, 1975.
18. Do Nascimento A, De Castro Barreto R, Bozzo L, De Almeida OP. Interaction of phenytoin and inflammation induces gingival overgrowth

- in rats. *J Periodont Res* 20 : 386-91, 1985.
19. Morasaki I, Mihara J, Kata K, Kitamura K, Adachi C, Sobue S, Hamada S. Phenytoin-induced with *Streptococcus sorbrinus 6715*. *Archs Oral Biol* 35(9) : 753-758, 1990.
 20. Dahllöf G, Modeer T, Otteskog P, Sundqvist K-G. Subpopulation of lymphocytes in connective tissue from phenytoin-induced gingival overgrowth. *Scand J Dent Res* 93 : 507-12, 1985.
 21. Rose GG, Robertson PB. Collagenolysis by human gingival fibroblasts cell lines. *J Dent Res* 56 : 416-26, 1977.
 22. Salo T, Oikarinen KS, Oikarinen AI : Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in normal human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med* 19 : 404-7, 1990.
 23. Hassel TM, Page RC, Narayanan AC, Cooper CG. Diphenylhydantoin(Dilantin) gingival hyperplasia : Drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 2092-2912, 1976.
 24. Basset BB, Packer L. Response of isolated lysozymes to Vitamin A. *J Cell Biol* 27 : 448-450, 1965.
 25. Sporn MB, Roberts AB. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 43 : 3034. 1983.
 26. Lawrence JD, Bern AH, Steadman GM. Vitamin A and keratinizing studies on the hamster cheek pouch *Annals of Oto Rhinol Laryngol* 69 : 645-660, 1960.
 27. 우건희, 권배근, 신형식 Aromatic retinoid(RO 10-9359)가 백서 악하선암에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한치주과학회* 20(2) : 326-340, 1990.
 28. Bern HA, Elias JJ, Pickett PI, Powers TR, Harkness MN. The influence of vitamin A on the epidermis, *Am J Anat* 4 : 419-48, 1955.
 29. Abe N, Ebina T, Ishida N. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhizin acid in mice. *Microbiol Immunol Japan* 26 : 535-539, 1982.
 30. Mizoguchi Y, Ikemoto Y, Arai T, Yamamoto S. Effects of glycyrrhizin on antibody production of PWM-stimulated lymphocytes in vitro. *Allergie, Japan* 33 : 328-335, 1984.
 31. Schroder EW, Rapaport E, Kabcenell AK, Black PH. Growth inhibitory and stimulatory effects of retinoic acid on murine 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79 : 1549-1552, 1982.
 32. Lee HY. Molecular analysis of the differentiation associated events and screening of new differentiation factors in F9 teratocarcinoma stem cells. *이화여자대학교 박사논문*. 1992.
 33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 : 55-63, 1983.
 34. Hong WS, Saijo N, Sasaki Y, Minato K, Nakano H, Nakagawa K, Fujimura Y, Nomura K, Twentyman PR. Establishment and characterization of cisplatin-resistant sublines of human lung cancer cell lines. *Int J Cancer* 41 : 462-467, 1988.
 35. Grippo JF, Gudas LJ. The effect of dibutyryl cyclic AMP and butyrate on F9 teratocarcinoma cellular retinoic acid-binding protein activity. *J Biol Chem* 262 : 4492-4509, 1987.
 36. Stoner CM, Gudas LJ. Mouse cellular retinoic acid binding protein ; cloning, complementary DNA sequences, and messenger RNA expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 wild type and RA-3-10 mutant teratocarcinoma. *Cancer Res* 49 : 1497-1504, 1989.
 37. Shafer WG. Effect of dilantin sodium on growth of human fibroblast-like cell cultures. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine* 104 : 198-201, 1960.
 38. Sklans S, Taylor RG, Shklar G. Effect of diphenylhydantoin sodium on healing of experimentally produced fractures in rabbit mandible. *J Oral Surg* 25 : 310-319, 1967.

39. Goebel RW. Sodium diphenylhydantoin association with oral healing. *J Oral Surg* 30 : 191–195, 1972.
40. Gilmore W, Giunta JL. The effect of 13-cis-retinoic acid on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Surg* 51 : 256–265, 1981.
41. Bollag W. Therapy of epithelial tumors with matrix analysis of nifedipine-induced gingival overgrowth : immunohistochemical distribution of different collagen types as well as the glycoprotein fibronectin. *J Periodont Res* 28 : 10–16, 1993.
5. Robert ML, Lydia PH, Brian AW. Nifedipine-induced gingival hyperplasia- A histochemical and ultrastructural study. *J Periodontol* 56(4) : 211–215, 1984.
6. Sooriyaamoorthy M, Grower DB, Eley BM. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. *J Periodont Res* 25 : 25–30, 1990.
7. Textbook of clinical periodontology. Munksgaard. 1983.
8. Angelopoulos AP, Goaz PW. Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34 : 898–906, 1972.
9. Schneir M, Ogata S., Fine A. Confirmation that neither phenotype nor hydroxylation of collagen is altered in overgrown gingiva from dihydroxydiphenylhydantoin-treated patients. *J Dent Res* 57(3) : 506–510, 1978.
10. Hassel TM, Page RC, Lindhe J. Histologic evidence for impaired growth control in diphenylhydantoin gingival overgrowth in man. *Arch Oral Biol* 23 : 381–4, 1978.
11. Hassel TM, Evidence for production of an inactive collagenase by fibroblasts from phytoin-enlarged human gingivae. *J Oral Pathol* 11 : 310–317, 1982.
12. Goultshin J, Shoskan S. Inhibition of collagen breakdown by diphenylhydantoin. *Biochem Biophys Acta* 631 : 188–91, 1980.
13. Kantor ML, Hassel TM, Increased accumulation of sulfated glycosaminoglycans in cultures of human fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Dent Res* 62 : 383–7, 1983.
14. Sooriyaamoorthy M, Harvey W, Gwer DB. The use of human gingival fibroblasts in culture for studying the effects of phenytoin on testosterone metabolism. *Archs Oral Biol* 33 : 353–359, 1988.
15. Southren AL, Rappaport SC, Gordon GG. et al. Specific 5 α -Dihydrotestosterone receptors in human-gingiva. *J Clin Endocr Metab* 47 : 1378–1382. 1978.
16. Vittek J, Gordon GG, Rappaport SC, et al. Cellular regulation of the metabolism of androgen aromatic acid analog. *Chemotherapy*. 21 : 236–247, 1975.
42. Mayer H, Bollag W, Hanni R, Ruegg R. Retinoids, a new class of compounds with prophylactic and therapeutic activities in oncology and dermatology. *Experientia* 34 : 1105–1119, 1978.
43. Goodman DS. Vitamin A metabolism. *Fed. Proc* 39 : 2716–2722, 1980.
44. Goodman DS. Vitamin A retinoids : Recent advances, introduction, background, and general view. *Fed. Proc* 38 : 2501, 1979.
45. Kumagai A, Yano S, Otomo M. Study on the corticoid-like action of glycyrrhizine and the mechanism of its action. *Endocrinol Japan* 4(1) : 17–27, 1957.
46. Kumagai AK, Yano S. Takeuchi K, Nishino K, Asauma Y, Nanaboshi M, Yamamura Y. An inhibitory effect of glycyrrhizine the antigranulomatous action of cortisone. *Endocrinology* 74 : 145, 1964.
47. Kumagai A, Nanaboshi M, Asanuma Y, Yagura T, Nishino K, Yamamura Y. Effect of glycyrrhizine on thymolytic and immunosuppressive action of cortisone. *Endocrinol Japan* 14(1) : 39–42, 1967(a).

48. Kumagai A, Asanuma Y, Yano S, Takeuchi K, Morimoto Y, Uemura T, Yamamura Y. Effect of glycyrrhizine on the suppressive action of cortison of the pituitary adrenal axis. *Endocrinol Japan* 13(3) : 234–244, 1966(a).
49. Kumagai A, Nishino K, Yamamoto M, Nanaboshi M, Yamamura Y. An inhibitory effect of glycyrrhizin on metabolic actions of cortisone. *Endocrinol Japan* 13(4) : 416–419, 1966(b).
50. Kumagai A, Nishino K, Shimomura A, Kin T, Yamamura Y. Effect of glycyrrhizin on estrogen action. *Endocrinol Japan* 14(1) : 34–38, 1967 (b).

사진부도 및 설명

- Fig. 2 Control group. The fibroblast cells had their normal stretched cytoplasmic processes (X16).
- Fig. 3 Phenytoin group. The fibroblast cells had their normal stretched cytoplasmic processes (X16).
- Fig. 4 Phenytoin and retinoic acid group. The fibroblast cells became round (X16).
- Fig. 5 Phenytoin and glycyrrhetic acid group. The fibroblast cells had their normal stretched cytoplasmic processes (X16).
- Fig. 6 Phenytoin, retinoic acid glycyrrhetic acid group. The fibroblast cells became round and the cytoplasmic processes were lost (X16).

논문사진 부도 (I)

논문사진 부도 (II)

논문사진 부도 (Ⅲ)

EFFECT OF DIPHENYLHYDANTOIN, RETINOIC ACID AND GLYCYRRHETINIC ACID ON THE CELL ACTIVITY OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST

Tai-Kyung Kim, Young-Wook Kim, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Some therapeutic agents and medicaments may lead to pathologic changes in the gingival tissue, especially on the cultured human gingival fibroblasts.

The purpose of this study was to investigate on the effect of diphenylhydantoin, retinoic acid to the human gingival fibroblast. Human gingival fibroblasts were cultured from the healthy gingiva of patients with orthodontic patients. Gingival fibroblasts were trypsinized and transferred to the wells of 96 well microtest plates. Next day, the medium was removed, fibroblasts were washed with HBSS, and the washed cells were cultured in growth medium added 5 or 10 μ g/ml of diphenylhydantoin, 10⁻⁵M, 10⁻⁶M and 10⁻⁷M of retinoic acid and glycyrrhetic acid. The passage number of cultured fibroblasts were fifth and eighth.

The cell morphology was examined by inverted microscope, the cell number was counted by hemocytometer, and cell activity was measured by the growth and proliferation assay using MTT assay. The fifth experiments were performed and statistical significance was measured by ANOVA. The cell morphology in the presence of retinoic acid was round irrespective of the presence of diphenylhydantoin and glycyrrhetic acid (Fig 2-6).

The proliferation of cells was not changed by diphenylhydantoin (Table 1).

The cell activity showed the tendency to increase at the concentration of 10 μ g/ml of diphenylhydantoin (Table 2). The cell activity in the presence of retinoic acid glycyrrhetic acid was decreased, and the increased cell activity by diphenylhydantoin was decreased by retinoic acid and glycyrrhetic acid at the concentration of 10⁻⁷M (Table 3-5).

These results suggested that the increased cell activity by diphenylhydantoin might be modulated by retinoic acid and glycyrrhetic acid.