

# 인체 치은섬유모세포에서 Lipopolysaccharides, Ursolic acid와 Oleanolic acid에 의한 Phenytoin 유도 세포활성에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 치주과학교실  
권오달 · 김윤성 · 신형식

## I. 서 론

Phenytoin으로 치료받는 환자의 약 50%는 심한 비염증성 치은증식을 보이는데, 발현빈도는 남녀공히 비슷하게 나타난다<sup>1-2)</sup>. 이러한 병소는 투약량, 환자의 나이 및 환자의 약물 처리능력과 관련되어 발생하는 것으로 보고되었고<sup>3-6)</sup>, 인체에서는 치은의 만성염증과 관련되는 것으로 보고되었다<sup>7-8)</sup>. Yamada등 (1977)<sup>9)</sup>은 백서에 대한 연구에서 치면세균막이 존재하는 부위에 국소적인 치은증식을 보인다고 보고하였다. 이러한 증식은 섬유모세포와 관련되어 나타나는 병소로 비교원성 기질 즉, sulfated glycosaminoglycan과 peptidoglycan의 증가와 교원성 기질의 감소가 보고되었는데<sup>10,11)</sup>, phenytoin에 의한 교원질 분해의 감소<sup>12,13)</sup>, 성장조절의 결합<sup>14)</sup>, 교원질의 표현형 및 hydroxylation의 변화, 비활성의 교원질 분해효소의 증가<sup>15)</sup>, 염증과의 관련성 및 Interleukin-1 등과의 관련성등이 다양하게 보고되었다<sup>16-20)</sup>. Morasaki등 (1990)<sup>21)</sup>과 Nascimento등 (1985)<sup>22)</sup>에 의하면 백서에서의 phenytoin에 의한 치은증식은 염증이 존재하거나 *S. sorbrinus* 6815를 감염시킨 경우에만 발생하였고, 염증 존재시에 더욱 심하고 치은절제술 후에 철저한 잇솔질로 감소될 수 있으나 치은의 용적의 증가는 일어날 수 있음을 보고하였다.

최근에 염증 및 증식을 보이는 치은조직에서 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone(5 $\alpha$ -DHT)의 형성이 뚜렷이 증가하였고, 이와 더불어 5 $\alpha$ -DHT에 대한 치은 수용체가 증가되고, 실험실에서의 인체 치은 섬유모세포 배양을 통한 연구에서는 5 $\alpha$ -DHT의 생합성이 두배까지 증가하며, 3, 4-ketoosteroid-5-alpha A ring re-

ductase enzyme system의 활성화에 관여하는 것으로 알려졌다<sup>23-27)</sup>. 또한, phenytoin이 치은조직에 미치는 영향으로는 T 세포매개에 의한 면역반응, 치은 섬유모세포의 증대, 교원질 분해의 감소 및 sulphated glycosaminoglycans의 측정등이 있었다고 제시되었다<sup>10)</sup>. 한편, Salo등 (1990)<sup>28)</sup>의 정상 치은섬유모세포 배양연구에서 전체 단백질 및 교원질의 합성은 감소시켰으나, 세포증식에는 영향이 없음이 보고되었고, Hassel등 (1976)<sup>29)</sup>은 낮은 활성을 보이고 섬유모세포에는 세포독성을 보이고 높은 활성을 보이는 세포에는 활성을 높여 기질형성이 증대됨이 작용기전으로 제시하였다.

최근에는 중양과 세포생물학의 연구에서 세포의 분화를 유도하는 제제에 대한 연구가 많이 시행되고 있는데, 김동 (1992)<sup>30)</sup>은 비타민 A 유도체인 retinoic acid와 glycyrrhetic acid가 phenytoin에 의하여 증대된 치은섬유모세포의 활성을 억제하는 효과가 있음을 보고하였고, Tokuda등 (1986)<sup>31,33)</sup>은 해열등의 항염작용과 이노작용을 갖는 금전초(*Glechoma hederacea*)의 성분인 ursolic acid와 oleanolic acid의 Epstein-Barr Virus 발현 억제와 retinoic acid와 유사하나 Raji cell에 대한 독성이 약하다고 보고하였고, Grippo등 (1987)<sup>40)</sup>은 ursolic acid와 oleanolic acid는 retinoic acid가 F9세포내 존재하는 retinol과 retinoic acid결합 단백질에 영향을 미쳐 세포의 형태를 변화시키는것과는 달리 steroid receptor와 결합하여 세포의 형태를 변화시키는 작용기전을 보고하였다.

저자는, 한국인에서 채취하여 배양한 건강한 치은섬유모세포를 이용하여 세균의 내독소, ursolic acid 및 oleanolic acid등이 phenytoin에 의하여 유

발된 세포활서에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

실험에 사용한 5, 5-diphenylhydantoin(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA), ursolic acid(Sigma chemical co., St. Louis MO, USA)와 oleanolic acid(Sigma chemical co., St. Louis, MO, USA)를 70% ethanol에 용해시켜 3MM filter로 여과하여 4℃에 보관후 사용하였다(Fig. 1). 본 실험에서 사용한 세균의 내독소는 *Fusobacterium nucleatum* 10953에서 분리한 lipopolysaccharides를 사용하였다. 세균의 배양은 Schaedler배지를 이용하여 냉동보관중인 균주를 혐기성 배양기(80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>; COY Lab. Products, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 37℃에서 통상적으로 36시간 혐기성으로 배양하였다. 배양된 세균은 원침(10,000×g, 20min, 4℃)하여 멸균된 생리식염수로 3회 세척한후 증류수로 1회 세척하여 냉동건조 하였다. 건조시킨 균체를 Westphal등 (1965)<sup>34)</sup>의 방법에 따라 68℃ 증류수 1ml에 균체 200mg이 되도록 하여 분산시킨 후 동일한 양의 90% (W/W) 689℃의 phenol(Merck)과 혼합하여 15분간 교반하면서 반응시켰다. 그후 얼음물에 10℃까지 식힌후 10,000×g로 30분간 원침시킨후 상층 수용액부분을 채취하고 동일한량의 증류수를 가하면서 2회반복하여 수집된 수용액 부분을 72시간동안 투석(dialysis)시킨후 냉동건조하여 내독소를 분리하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 치은섬유모세포의 배양

원광대학교 치과대학 부속병원 교정과에 교정치료를 위하여 내원한 10세 전후의 환자 소구치를 발치하면서 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은을 40% 우태아혈청(fetal bovine serum(FBS), GIBCO Co., NY, USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., NY, USA)를 첨가한 α-MEM(Minimal Essential Medium, GIBCO Co., NY, USA)에서 3회 세척하였다.

세척한 치은조직을 60mm 세포배양용 ; etri dish (Coning Co., NY USA)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No. 15 scalpel 2개를 이용하여 1mm<sup>2</sup>로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 펴 놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100% 배양기(Sheldon Manufacturing, Inc. Oregon USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 1% 항생제를 첨가한 α-MEM을 사용하고 단일 세포충이 형성될%재 3일 간격으로 교환하였다.

Petri dish 내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution, GIBCO Co., NY, USA)로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위하여 HBSS를 제거하고, 0.25% Trypsin-DETA(GIBCO Co., NY, USA)를 dish 2ml씩 넣고, 3분간 bench 상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심

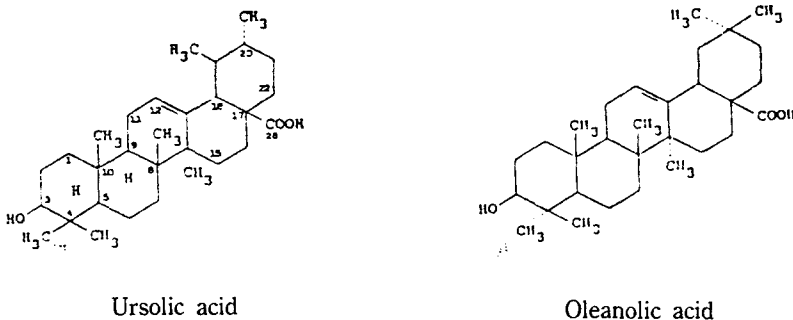


Fig. 1. Structural formula of ursolic acid and oleanolic acid

분리하였다. 상청액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 2회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 분주하였다. 분주 비율은 1:3 내지 1:4으로 하고 같은 방법으로 5회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2) Phenytoin, 세균의 내독소, ursolic acid와 oleanolic acid가 치은섬유모세포형태에 미치는 영향;

5µg/ml의 phenytoin, 10<sup>-7</sup>M의 ursolic acid와 oleanolic acid를 가한 배양액에서 1일 배양한 후 MEM을 가한 경우, ethanol을 가한 경우, phenytoin에 내독소를 가한 경우 및 여기에 ursolic acid나 oleanolic acid를 가한 경우로 분류하여 도립 현미경(inverted microscope)을 이용하여 세포형태를 관찰하였다.

3) Ursolic acid와 oleanolic acid가 내독소의 유무에 따라 phenytoin에 의하여 유도된 치은섬유모세포의 활성에 미치는 영향

5µg/ml의 phenytoin, 세균의 내독소, ursolic acid와 oleanolic acid를 가하여 1일 및 3일 배양한 후, 세포활성을 측정하기 위하여 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromid : No. M2128, Sigam Co., St. Louis, USA)용액 50µl를 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT용액을 버리고, DMSO를 50µl씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시켰다<sup>35, 36)</sup>. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)로 640nm를 기준으로 577 nm에서 흡광도를 측정하였다.

매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을

대조군으로 설정하여 모든 실험결과는 다음과 같이 대조군의 배분율로 산출하였다.

세포활성도(%) = 실험 well의 흡광도/대조 well의 흡광도 × 100

#### 4) 통계분석

약물의 존재에 따른 각군의 세포생존능력의 평균치와 표준편차를 구하고 상호간의 차이를 일원분산 분석법(ANOVA)으로 분석하였다.

### III. 연구결과

1) Phenytoin과 lipopolysaccharides, phenytoin과 lipopolysaccharides에 ursolic acid를 가한 군, phenytoin과 lipopolysaccharides에 oleanolic acid를 가한 군에서 치은섬유모세포 형태의 변화:

MEM을 첨가한 경우 정상적인 세포돌기를 보였고(사진부도 1), ethanol을 가한경우, phenytoin에 세균의 내독소를 가한경우에 세포돌기의 소실과 둥근세포로 변화하였고, phenytoin에 ursolic acid 및 oleanolic acid를 가한 경우의 세포형태도 세균의 내독소의 존재와 관계없이 치은섬유모세포의 세포돌기의 소실과 둥근 형태의 세포로 변화된것을 관찰하였다(사진부도 2-7).

2) Phenytoin과 lipopolysaccharides가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향:

Phenytoin에 의한 세포활성은 세균의 내독소가 0.5 µg/ml의 농도에서 120.23 ± 17.48였으며, 5µg/ml의 농도에서 114.51 ± 34.48로 ethanol을 가한 대조군

Table 1. Effect of Phenytoin and Lipopolysaccharides on the Cell Activity of Human Gingival Fibroblast (Mean ± S.E.)

Group	Day	
	1st day	3rd day
Cortron (n=9)	100.00 ± 21.05	100.00 ± 29.37
Phenytoin + Lipopolysaccharide (0.5µg/ml) (n=9)	120.23 ± 17.48*	104.07 ± 28.85
Phenytoin + Lipopolysaccharide (5µg/ml) (n=9)	114.51 ± 34.48	108.58 ± 30.87

Phenytoin : 5µg/ml

\* : P < 0.05 significantly different from control

Table 2. Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on the Cell Activity of Human Gingival Fibroblast at a Day(Mean± S.E.)

Group Concentration	Ursolic acid(UA) (n=5)	Oleanolic acid(OA) (n=5)	UA+OA (n=5)
Control	100.18± 27.17*	100.18± 27.17	100.00± 2.32
10 <sup>-7</sup> M	45.61± 22.94*	45.41± 10.76*	85.64± 14.72

\* P<0.05 significantly different from control

Table 3. Effect of phenytoin, Lipopolysaccharides and Ursolic Acid on the Cell Activity of Human Gingival Fibroblast(Mean± S.E.)

Group	Day	
	1st day	3rd day
Control(n=6)	100.18± 27.17	100.00± 2.32
P+UA(n=6)	42.85± 17.08*	86.34± 15.99
P+LPS+UA(n=6)	46.08± 22.07*	84.43± 11.49

P : Phenytoin(5µg/ml) LPS : Lipopolysaccharides  
UA : Ursolic acid(10<sup>-7</sup>M)

\* : P<0.05 significantly different from control

Table 4. Effect of phenytoin, Lipopolysaccharides and Oleanolic Acid on the Cell Activity of Human Gingival Fibroblast(Mean± S.E.)

Group	Day	
	1st day	3rd day
Control(n=6)	100.18± 27.17	100.00± 2.32
P+OA(n=6)	67.65± 11.05*	86.43± 1.16
P+LPS+OA(n=6)	43.69± 6.25**	62.30± 2.31**

P : Phenytoin(5µg/ml) LPS : Lipopolysaccharides  
OA : Oleanolic acid(10<sup>-7</sup>M)

\* : P<0.05 significantly different from group added LPS

\*\* : P<0.05 significantly different from control

(100.00± 21.05)에 비하여 증가되었다(Table 1).

3) Ursolic acid 및 oleanolic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향 :

Ursolic acid 및 oleanolic acid는 10<sup>-7</sup>M의 농도에서 각기 45.62± 22.94% 및 45.41± 10.78로 대조군에 비하여 감소하였다(Table 2).

4) Phenytoin, lipopolysaccharides 및 ursolic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향 :

배양 1일째 5µg/ml의 농도에서 phenytoin과 lipopolysaccharides에 10<sup>-7</sup>M의 ursolic acid를 가한 경우 및 phenytoin과 ursolic acid를 가한 경우의 세포활성은 각기 46.08± 22.07과 2.85± 17.08로 대조군에 비하여 유의하게 낮았으나, 배양 3일째는 대조군과 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Table 3).

5) Phenytoin, lipopolysaccharides 및 oleanolic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향 :

배양 1일째 5µg/ml의 농도에서 phenytoin과 lipo-

polysaccharides에 10<sup>-7</sup>M의 oleanolic acid를 가한 경우의 세포활성은 43.69± 6.25로 phenytoin과 oleanolic acid를 가한 경우의 67.65± 11.05 및 대조군에 비하여 유의하게 낮았으나, 배양 3일째 phenytoin과 lipopolysaccharides에 oleanolic acid를 가한 군은 62.30± 2.31로 대조군에 비하여 유의하게 낮았다(Table 4).

#### IV. 총괄 및 고안

치은대비는 국소적인 원인의 만성염증에 의하여 발생하는 만성 염증성 비대와 phenytoin등의 약물을 복용하여 발생하는 비염증성 비대가 존재하는 것으로 보고되었다. 만성 염증성 치은비대는 염증액, 세포 삼출액, 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 구강 환경 인자의 제거로 완치될 수 있다<sup>1)</sup>.

비염증성 치은대비중 간질환자에게 투여하는 약제인 phenytoin의 복용으로 발생하는 치은비대는 혈장과 타액내 농도와 관련이 있는 것으로 초기에는 무통성으로 치간유두나 변연치은에 구슬모양으로 시작하여 점차 치관을 덮게되며 궁극적으로 교합장애를 야기하기도 하는 것으로 보고되었다. 염증과 합병되지 않는 한 치은은 단단하고 상실상(mulberry-shaped)이며 선홍색의 탄력을 가지고, 출혈경향도 보이지 않고 가는 선으로 분리됨이 보고되었다. 또한, phenytoin에 의한 치은비대는 국소적 자극유무에 관계없이 발생하며 호발부위는 구강전체에서 발생하나 특히 상하악 전치부에 빈발하고 발치와 함께 소실된다. 조직병리학적으로 관찰하면 상피와 결체조직의 두드러진 증식과 상피의 극세포증, 상피돌기가 길어져 결체조직 내부에 깊숙히 확산됨이 보고되었으며, 재발된 치은비대에서는 수많은 모세혈관 섬유모세포와 불규칙한 교원성 섬유가 나타남이 보고되었다<sup>1)</sup>.

본 연구에서 phenytoin에 세균의 내독소, ursolic acid와 oleanolic acid를 가한 경우에 세포돌기의 소실과 등근 형태의 세포로 변화하였는데 ursolic acid와 oleanolic acid는 정상세포의 분화와 관련되는 것으로 생각된다(사진부도 1-7)<sup>31-33)</sup>. 또한, 신선하게 배양된 치은섬유모세포의 세포활성이 phenytoin과 세균의 내독소에 의하여 증대됨을 관찰할 수 있었다(Table 1). 이러한 세포활성의 증대현상은 표준 세포주에서는 관찰되지 않는 현상으로 건강한 세포만이 이 약물에 대한 수용기가 존재하는 것으로 생각되며, Shafer등 (1960)<sup>18)</sup>이 보고한 치은섬유모세포의 증식과 단일세포의 세포활성 증가와 관련이 있는 것으로, 이러한 약제에 의한 효과가 세포증식에 영향을 미치거나, mRNA 수준에서의 효과이며, ursolic acid와 oleanolic acid의 효과도 이러한 세포증식 및 mRNA 수준의 억제효과로 보고되었다<sup>37)</sup>. 이러한 phenytoin에 의한 세포활성의 증가는 증식을 보이는 치은조직에서 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone(5 $\alpha$ -DHT)의 형성의 증대, 5 $\alpha$ -DHT에 대한 치은 수용체의 증가 및 실험실에서 인체 치은섬유모세포 배양을 통한 연구에서 5 $\alpha$ -DHT의 생합성이 두배까지 증가하여

치은섬유모세포의 활성화에 영향을 미친다는 보고<sup>25, 26)</sup>와 관련이 된다. 이러한 세포활성의 증대는 phenytoin 투여후 골질의 치유나 발치와의 치유가 촉진된다는 보고와도 관련이 있는 것으로 생각된다<sup>38, 39)</sup>.

최근에 종양과 세포생물학의 연구분야에서 세포의 분화를 유도하는 제제에 대한 연구가 많이 시행되고 있는데, 김등(1992)<sup>30)</sup>은 비타민 A 유도체인 retinoic acid와 glycyrrhetic acid가 phenytoin에 의하여 증대된 치은섬유모세포의 활성을 억제하며 등근형태의 세포로 변화하였다고 보고하였는데, 본 연구에서 retinoic acid보다 Reji cell에 대한 독성이 약한것으로 보고된<sup>31)</sup> ursolic acid와 oleanolic acid 투여시 이와 유사한 phenytoin에 의한 치은섬유모 세포활성의 억제 및 등근형태의 세포를 관찰하였다. 본 연구에서 사용된 ursolic acid와 oleanolic acid는 서로 같은 기전으로 steroid receptor에 작용하여 세포형태를 변화시키는 작용을 보이며 이는 retinoic acid가 세포내 존재하는 특이 retinoic acid결합 단백질을 통하여 발현하는 것과는 다른 기전인 것으로 보고되었다<sup>40)</sup>. 한편, 본 연구에서는 phenytoin 단독투여나 세균의 내독소 존재시에 세포활성의 증대를 보였는데, 이는 이 약물이 세포의 활성화와 관련이 있으며, ursolic acid나 oleanolic acid를 가했을 때 증대된 세포활성이 감소되는 것은 이들이 phenytoin 및 세균의 내독소와 경쟁적으로 작용하는 것으로 생각된다. 또한, 세포활성의 증대는 이러한 물질이 5 $\alpha$ -DHT와 같은 표적 유전자를 발현시키고, 여기에서 만들어진 5 $\alpha$ -DHT가 세포에 존재하는 5 $\alpha$ -DHT 수용기를 자극하여 세포활성의 변화를 일으키는 것으로 추정된다<sup>25, 26)</sup>. 이러한 현상은 약물간의 길항작용 및 상승작용으로 생각되고, 신선하게 배양한 단일세포에 시호전달등에 대한 연구및 이를 통한 세포의 화생기전에 대한 연구, 세균의 내독소를 이용한 동물모형의 개발과 ursolic acid 및 oleanolic acid를 이용한 치은증식억제에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

Phenytoin에 의하여 유도된 세포활성에 세균의 내독소가 미치는 영향과 ursolic acid 및 oleanolic acid에 의한 세포활성 변조를 관찰하고자, 위상차

현미경을 이용한 세포형태 관찰과 MTT법을 이용한 세포의 활성을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Ursolic acid나 oleanolic acid를 사용한 실험군에서 세포돌기의 소실을 보였다.
2. 세균의 내독소는 농도에 관계없이 phenytoin의 세포활성을 증대시켰다.
3. Ursolic acid나 oleanolic acid를 사용한 실험군에서 세포의 활성이 감소되는 것이 관찰되었다.
4. Ursolic acid와 oleanolic acid를 phenytoin과 같이 배양했을 때의 세포활성은 대조군보다 감소하였다.
5. Ursolic acid와 oleanolic acid를 phenytoin과 세균의 내독소와 같이 배양했을 때 세포활성이 대조군보다 감소하였다.

이상의 연구결과 phenytoin과 세균의 내독소에 의하여 치은섬유모세포의 세포활성이 증대되었고, ursolic acid 및 oleanolic acid는 phenytoin에 의해서 증가된 세포활성을 감소시킨 것으로 관찰되었다.

### 참고문헌

1. 치주과학교수협의회. 치주과학 지영문화사 3 : 152, 1992.
2. Angelopoulos AP, Goaz PW. Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34 : 898-906, 1972.
3. Frankel SI. Dilantin sodium in the treatment of epilepsy. *J Am Med Assoc* 114 : 1320-1321, 1940.
4. Hassell TM, Page RC. The major metabolites of phenytoin(DILANTIN) induces gingival overgrowth in cats. *J Periodon Res* 13 : 280-282, 1978.
5. Babcock JR, Nelson GH. Gingival hyperplasia and dilantin content of saliva : a pilot study. *J Am Dent Assoc* 68 : 195-198, 1964.
6. Bressman R, Robinson F, Bemveniste K. The role of Phenytoin in the etiology of gingival overgrowth. IADR 60th General session. Abstract number 180.
7. Angelopoulos AP. Diphenylhydantoin gingival hyperplasia. A clinicopathological review. I. Incidence, clinical features and histopathology. *J Can Dent Assoc* 41 : 103-6, 1975.
8. Steinberg CS, Steinberg AD. Phenytoin-induced gingival overgrowth control in severely retarded children. *J Periodontol* 53 : 429-433, 1982.
9. Yamada S, Sato T, Miake K. Experimental pathological studies on gingival hyperplasia in rat. (1) Macroscopical and microscopical observations. *The Bull Tokyo Dent Coll* 18 : 181-193, 1977.
10. Kantor L, Hassel TM. Increased accumulation of sulfated glycosaminoglycans in cultures of human fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Dent Res* 62 : 383-7, 1983.
11. Vernillo AT, Schwartz NB. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production by phenytoin 5, 5-diphenylhydantoin in monolayer cultures of mesenchymal cells derived from embryonic chick sternae. *Archs Oral Biol* 31(12) : 819-823, 1986.
12. Goulttschin J, Shoskan S. Inhibition of collagen breakdown by diphenylhydantoin. *Biochem Biophys Acta* 631 : 188-91, 1980.
13. Schneir M, Ogata S, Fine A. Confirmation that neither phenotype nor hydroxylation of collagen is altered in overgrown gingiva from diphenylhydantoin-treated patients. *J Dent Res* 57(3) : 506-510, 1978.
14. 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.
15. Hassell TM. Evidence for production an inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingivae. *J oral Pathol* 11 : 310-317, 1982.
16. Dahllöf G, Reinholt FP, Hjerpe A, Modeer T. A quantitative analysis of connective tissue components in phenytoin-induced gingival overgrowth in children-A stereological study. *J Pe-*

- rior Res 19 : 401-407, 1984.
17. Dahlöf 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.
  18. 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.
  19. Ebadi MS, Scott PM. Increase in collagen level by diphenylhydantoin as possible mechanisms of drug-induced gingival hyperplasia. Clin Toxicol 4(1)39-46, 1971.
  20. Kasai S, Hachimine K. Effect of 5, 5-diphenylhydantoin sodium on the synthesis of collagen by some fibroblast cell lines including gingiva derived cells. Bulletin of Tokyo Dental College 15(2) : 53-62, 1974.
  21. Morisaki 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.
  22. 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.
  23. Vittek J, Gordon GG, Rappaport SC, et al. Cellular regulation of the metabolism of androgens 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.
  24. Tamura Y. Study of effects of glycyrrhetic acid and its derivatives on  $\Delta^4\alpha$  and  $5\beta$ -reductase by rat liver preparations. Folia endocrinol jap 51 : 589-600, 1975.
  25. Southren AL, Rappaport SC, Gordon GG, et al. Specific 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone receptors in human gingiva. J Clin Endocr Metab 47 : 1378-1382, 1978.
  26. Sooriyamoorthy M, Harvey W, Gwer DB. The use of human gingival fibroblasts in culture fr studying the effects of phenytoin on testosterone metabolism. Archs Oral Biol 33 : 353-359, 1988.
  27. Rose GG, Robertson PB. Collagenolysis by human gingival fibroblasts cell lines. J Dent Res 56 : 416-26, 1977.
  28. Salo T, Oikarinen KS, Oikarinen AI : Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in normal hman gingival fibroblasts. J Oral Pathol Med 19 : 404-7, 1990.
  29. Hassel TM, Page RC, Narayanan AS, Cooper CG, Diphenylhydantoin(Dilantin) gingival hyperplasia : Drug-induced abnormality of connective tissue. Proc Natl Acad Sci USA 73 : 2902-2912, 1976.
  30. 김태경. Diphenylhydantoin, retinoic acid 및 glycyrrhetic acid가 치은섬유모세포활성에 미치는 영향에 관한 연구. 원광치의학 3(2) : 19-34, 1993.
  31. Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito Y. Inhibitory effects of ursolic acid and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Letters 33 : 279-285, 1986.
  32. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희. 한약임상응용. 성보사 : 172-173, 1986.
  33. Lee HY. Molecular analysis of the differentiation associated events and screening of new differentiation factors in F9 teratocarcinoma stem cels. Mol Cells 2 : 149-154, 1992.
  34. Westphal O & K. Jann. Bacterial Lipopolysaccharide : Extraction with Phenol, water and further application of treatment procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry 5 : 83-91, 1965.
  35. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to prolipeparation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65 : 55-63, 1983.
  36. Hong WS, Saijo N, Sasaki Y, Minato K, Nakano H, Nakagawa K, Fujimura Y, Nomura K, Twentym PR. Establishment and characterization

- of cisplatin-resistant sublines of human lung cancer cell lines. *Int J Cancer* 41 : 462–467, 1988.
37. 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.
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. Grippo JF, Gudas LJ. The effect of dibutyl cAMP and butyrate on F9 teratocarcinoma cellular retinoic acid-binding protein activity. *J Biol Chem* 262 : 4492–4509, 1987.



## 사진부도 및 설명

- 사진부도 1. MEM group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells had their normal stretched cytoplasmic processes( $\times 16$ ).
- 사진부도 2. Control group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular( $\times 16$ ).
- 사진부도 3. Phenytoin and LPS group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular ( $\times 16$ ).
- 사진부도 4. Phenytoin and ursolic acid group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular( $\times 16$ ).
- 사진부도 5. Phenytoin and oleanolic acid group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular( $\times 16$ ).
- 사진부도 6. Phenytoin, LPS and ursolic acid group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular( $\times 16$ ).
- 사진부도 7. Phenytoin, LPS and oleanolic acid group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular( $\times 16$ ).

## 논문 사진부도

사진부도 1

사진부도 2

사진부도 3

사진부도 4

사진부도 5

사진부도 6

사진부도 7

## EFFECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDES, URSOLIC ACID AND OLEANOLIC ACID ON PHENYTOIN-INDUCED CELL ACTIVITY IN HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST

Oh-Dal Kwon, Yoon-Sung Kim, Hyung-Shik Shin

*Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University*

Gingival hyperplasia is frequently associated with the long-term use of phenytoin for control of convulsive disorder. The purpose of this study was to investigate on the effects of lipopolysaccharides (LPS), ursolic acid and oleanolic acid to phenytoin-induced cell activity in human gingival fibroblast.

Human gingival fibroblasts were cultured from the healthy gingiva of orthodontic patients. Gingival fibroblasts were trypsinized and transferred to the wells of microtest plates. Fibroblast were cultured in growth medium added 5 $\mu$ g/ml of phenytoin, 5 $\mu$ g/ml of LPS, 10<sup>-7</sup>M of ursolic acid and oleanolic acid. The passage number of cultured fibroblasts were fifth and eight. Cell morphology was examined by inverted microscope and the cell activity was measured by proliferation assay. Ursolic acid significantly modulated cell morphology into globular shape at the concentration of 10<sup>-7</sup>M in the presence of phenytoin and LPS, and the cell activity was significantly decreased by ursolic acid or oleanolic acid regardless of the presence of phenytoin and LPS.

These results suggested that the increased phenytoin-induced cell activity might be modulated by ursolic acid regardless of the presence of phenytoin and LPS.

These results suggested that the increased phenytoin-induced cell activity might be modulated by ursolic acid or oleanolic acid. Further study is needed to clarify their toxicological effects on cellular modulation and mRNA expression change.

Key word : phenytoin ; cell activity ; cultured human gingival fibroblast ; gingival hyperplasia ; oleanolic acid ; ursolic acid