

Nifedipine이 건강 치은 조직의 치은 섬유모세포에 미치는 영향

신형식* · 한희란* · 김명은**

*원광대학교 치과대학 치주과학교실

**원광대학교 생물학과

I. 서론

치은과증식은 치은이 정상크기보다 더 커진 상태를 의미하며 불량한 구강위생상태, 음식물 잔사의 침착, 구호흡과 같은 국소적 요인과 전신적 요인에 의해 야기될 수 있다. 치은과증식을 원인과 병인에 의해 분류하면 크게 염증성과 비염증성 치은과증식으로 분류되어지고 그 중 비염증성 치은과증식은 국소적 원인이 아닌 약물치료나 그 외 원인불명의 유전성, 가족성으로 발생하는 경우이다.

간질환자의 치은에서의 과증식 변화가 phenytoin과 관련있다는 것이 1939년 Kimball에 의해 처음 소개되었고 그 후 치은과증식이 phenytoin으로 치료받은 환자의 10-50%에서 발생되어진다고 하였다²³⁻²⁶⁾. 치은과증식은 phenytoin 치료를 시작한지 6개월 이내에 발생하고¹⁾, 비록 주의깊은 구강위생이 발생을 감소시킬 수 있으나 치태조절에 의해 완전히 예방되지는 못한다고 하였다²⁾.

1984년 Ramon등에 의한 첫 증례보고를 비롯하여 많은 보고들이 dihydropyridine calcium-channel blockers의 하나인 nifedipine을 치은과

증식의 원인으로써 관련되었다²⁷⁾. Nifedipine에 의한 치은과증식의 발생율은 65%²⁸⁾, 10% 이상²⁹⁾, 15%³⁰⁾ 그리고 20%²³⁾ 등으로 보고되었고, 이런 부작용은 또한 sodium valporate³¹⁾, cyclosporin A³²⁾, diltiazem³³⁾, verapamil³⁴⁾ 그리고 nicardipine³⁵⁾을 복용하는 환자들에게서도 보고되었다.

Nifedipine은 협심증과 고혈압의 치료에 점점 더 많이 사용되어지는 지속성 혈관확장제로 세포막 칼슘통로(calcium channel)를 통한 세포막 내부로의 칼슘유입을 차단하여 심장 혈관근무늬근을 이완시키는 작용을 한다³⁾. 이 nifedipine에 의해 야기되는 치은과증식의 병인론 기전에 대해서는 여러 가설들이 발표되었으나 아직 정확한 기전에 대한 정보는 거의 없고⁴⁾ 세포배양연구의 결과들도 서로 모순되고 있다⁵⁾. Hassell과 Cooper는 phenytoin에 의해 야기되는 치은과증식의 병인론을 설명하기 위해 "cell subpopulation theory"를 제안하였는데, 모양적으로 비슷한 치은섬유모세포가 "responder"와 "non-responder"로 나누어지고, 그 중 responder fibroblast가 치은과증식에서 우세한 세포가 된다고 보고하였다³⁶⁾.

Nishikawa 등은 치은과증식이 있는 환자의 치은섬유모세포가 non-responder보다 낮은 증식을 보였으며, 배양기간 동안의 nifedipine은 세포증식에 영향을 끼치지 않는다고 보고하였다¹⁹⁾.

Nishikawa 등은 2명의 환자 중 1명으로 부터 채취한 치은섬유모세포에서 nifedipine이 in vitro상에서 세포증식과 교원질 합성에 직접적인 영향을 미치지 않는다고 주장하였다²⁰⁾.

Hassell과 Sobhani는 치은 결체조직세포들 (fibroblast-like cells)에 대한 여러 dihydropyridines의 직접적 효과를 측정하였고 또 인간의 정상 치은섬유모세포의 25개 분리종에서 단지 1 경우에서만 배양 배지내의 다양한 dihydropyridine의 직접적 첨가에 의해 양성으로 반응한다는 것을 발견하였다²¹⁾.

본 연구의 목적은 치은과증식에 대한 calcium-channel blockers의 하나인 nifedipine의 효과를 명확하게 하기 위해 세포증식도와 단백질 합성에서의 변화를 조사하기 위함이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 재료

(1) 치은섬유모세포의 배양

치은섬유모세포는 교정치료를 위하여 발거한 소구치나 매복된 제3대구치의 치은으로부터 얻었다. 간단히 설명하면, 발거한 치아를 HBSS(Hank's balanced salt solution, GIBCO/BRL, USA)로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거하였다. 세척한 치아를 100mm 조직배양용 접시에 옮기고 15번 blade를 이용하여 우태아 혈청(GIBCO/BRL, USA) 10%와 항생제(Penicillin G 10,000units/ml, Streptomycin 10,000 μ g/ml 및 Amphotericin B 25 μ g/ml, GIBCO/BRL, USA) 1%를 포함한 α -MEM(minimum essential medium,

GIBCO/BRL, USA)내에서 치은조직을 채취한 후 이들을 1mm²로 세절하여 60mm 조직배양용 접시에 5-6개의 조각을 위치시켰다. 그 후 약 30분간 37°C, 5% CO₂, 습도 100%의 배양기에서 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 10% 우태아 혈청과 1% 항생제가 첨가된 α -MEM 3ml씩을 첨가하고, 단일 세포층이 형성될 때까지 2-3일 간격으로 배양액을 교환하면서 계대배양을 실시하였다. 치은섬유모세포 성분중 전형적인 섬유모세포의 형태를 보이는 plate를 선택하여 사용하였다. 본 실험은 5~8회 계대배양된 치은섬유모세포를 이용하였다.

2. 방법

(1) 세포증식도

1) Cell Counting

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치은섬유모세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^4 의 세포를 분주하였다. 0, 100 및 200ng/ml nifedipine(Sigma CO., LO., USA)을 배양액에 첨가하고, 1, 3, 5, 7 및 10일 동안 세포배양을 실시하였다.

세포를 trypsinization하여 trypan blue로 염색하고 살아있는 세포수를 혈구계수기를 이용하여 측정하였다. 실험은 4회 반복하여 시행하였다.

2) MTT assay

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치은섬유모세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^4 의 세포를 분주한 후 1일동안 CO₂ 배양기에서 배양하여 0, 100 및 200ng/ml nifedipine을 첨가하여 배양액에서 1, 3, 5, 7, 10일 동안 세포배양을 실시하였다. 75% ethanol을 희석하여 첨가한 α -MEM에서 배양한 세포를 대조

군으로하여 실험군과 동일한 시간동안 배양하였다. 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배양액을 제거하고, 새 배양액 1 ml을 각 well에 첨가하였다. 이어서 24-well plate에 부착되어 있는 세포의 양을 알아보기 위해 생리식염수에 용해한 MTT용액 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma Co., L.O., USA) 200 μ l을 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 200 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma Co., USA)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Tokyo, Japan)로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였고, 각 실험은 4회 반복하여 실시하였다.

$$\text{세포 증식도} = \frac{\text{실험군의 세포증식도}}{\text{대조군의 세포증식도}} \times 100$$

(2) 치은섬유모세포의 총단백질 합성 및 교원질 합성능 측정²²⁾

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치은섬유모세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^4 의 세포를 분주한 후 1일동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후 0, 100 및 200ng/ml nifedipine을 첨가하여 배양액에서 1, 3, 5, 7, 10일 동안 세포배양을 실시하였다. 75% ethanol을 희석하여 첨가한 α -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로하여 실험군과 동일한 시간동안 배양하였다.

실험기간 마지막 4시간 전에 3 μ Ci/ml의 ³H-proline(L-[5-³H] proline, TRK 323, 1mCi, Amersham Co., U.K.)을 첨가하고 4시간동안 세포배양한 다음 배양액을 제거하였다.

Trypsinization한 다음 1,400rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 0.5ml 증류수를 첨가한 후 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 용해시켰다. 여기에 0.5ml의 냉 20% TCA/ 2 mM proline을 첨가하고, 0°C에서 5분간 방치하였다. 4°C에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 0.4ml의 0.2N NaOH를 첨가하였다. Eppendorf tube에 0.2ml의 시료를 나누어 넣고 각 tube에 0.15ml의 0.15N HCl, 1M HEPES buffer(pH 7.2), protease inhibitor I(Aminocaproic acid, N-ethylmaleimide), protease inhibitor II (Phenylmethyl sulfonyl fluoride, pepstatin) 및 CaCl₂ 등을 넣고 교원질을 측정하기 위한 tube에는 collagenase type VII(Sigma Co., L.O., USA) 15U를 첨가하고, 총 단백질량을 측정하기 위한 tube에는 collagenase를 첨가하지 않고 37°C 진탕수욕조에서 90분간 배양하였다. 각 tube에 0.5ml의 냉 10% TCA/0.5% tannic acid를 첨가하고 0°C에서 5분간 방치한 다음 4°C에서 1,000rpm으로 5분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상층액과 collagenase를 처리한 tube의 침전물에 1ml의 0.2N NaOH에 용해시킨 시료를 liquid scintillation counter에서 방사선량을 측정하여 아래의 공식으로 총 단백질량과 교원질 합성능을 산출하였다. 각 실험은 4회 반복하여 시행하였다.

Total protein = noncollagenous protein + collagenous protein

$$\text{PCS} = \frac{\text{dpm in collagen} \times 100}{(\text{dpm in noncollagenous protein} \times 5.4) + \text{dpm in collagen}}$$

PCS : percent collagen synthesis(%), dpm : disintegration per minute

3) 통계분석

통계학적 유의성은 일원분산분석법(

ANOVA)을 이용하여 통계분석 하였다.

III. 연구 결과

1. Nifedipine처리가 치은섬유모세포의 증식에 미치는 영향

(1) Cell counting

정상적인 치은섬유모세포에 100, 200ng/ml 농도의 nifedipine을 첨가하여 10일간 배양한 경우 세포증식에 영향을 미치지 않았다(Table 1).

10일동안의 각 농도에 대한 세포증식 양상은 대조군과 100ng/ml농도의 nifedipine에 배양한 경우 세포증식이 7일째에 최대로 증가하였고 그후 점차 감소되는 경향을 보였으며, 200ng/ml 농도의 nifedipine에 배양한 경우에

Table 1 Effect of nifedipine on cell proliferation of human gingival fibroblasts(cell counting)

Day \ Concentration	1	3	5	7	10
0	2.16±0.14	2.16±0.52	2.32±0.52	4.34±0.14	4.08±0.72
100	1.92±0.38	2.32±0.76	2.42±0.14	4.08±0.52	3.76±0.44
200	2.16±0.58	2.08±0.38	3.58±0.14	4.58±0.76	5.08±0.94

Data were expressed as mean(cell number × 10⁴) ± S.D.(p<0.05)

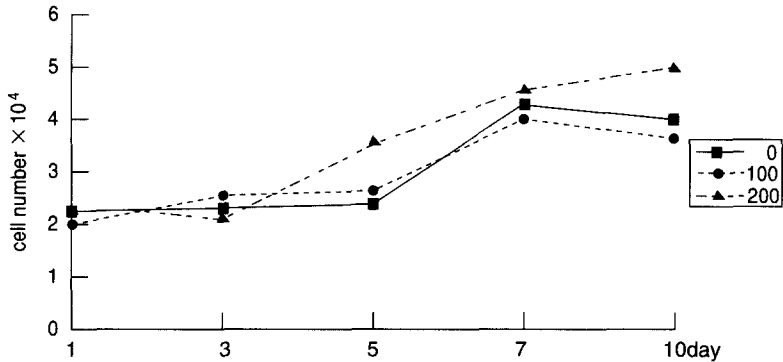


Fig 1 Effect of nifedipine on cell proliferation of human gingival fibroblasts (cell counting)

Table 2 Effect of nifedipine on cell proliferation of human gingival fibroblast (MTT assay)

Day \ Concentration	1	3	5	7	10
0	100.00±18.97	100.00±20.24	100.00±10.10	100.00±11.11	100.00±25.68
100	141.30±37.52	111.40±8.26	115.85±51.64	126.03±22.16	145.15±31.32
200	118.65±17.40	122.58±12.98	98.90±41.45	120.13±18.56	138.70±32.76

Data were expressed as mean(%) ± S.D.(p<0.05)

는 지속적인 증가양상을 보였다(Fig 1).

(2) MTT assay

정상적인 치은섬유모세포를 100, 200ng/ml 농도의 nifedipine에 10일간 배양하여 MTT assay를 시행 한 경우 대조군에 비해 약간의 증가양상을 보이나 통계학적 유의성은 없었다(Table 2).

2. 치은섬유모세포의 총단백질 합성 및 교원질 합성능 측정

정상적인 치은섬유모세포에 100, 200ng/ml 농도의 nifedipine을 첨가하여 배양한 군의 총단백질 합성능은 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 보였다(Table 3).

총단백질 합성능중 교원질이 차지하는 비율을 나타내는 percent collagen synthesis는 200ng/ml 농도의 nifedipine의 경우에서만 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 보였고, 100ng/ml 농도의 nifedipine의 경우에서도 비록 통계학적인 유의성은 없으나 약간의 감소가 관찰되었다(Table 3).

IV. 총괄 및 고찰

치은과증식은 nifedipine, phenytoin 등의 잘 알려진 부작용이고 일반적으로 치은변연에 영향을 미치는 섬유성 과증식으로 간주되어 진다. Nifedipine치료와 관련된 치은섬유모

포의 과증식은 임상적으로 치은조직양의 국소적 또는 전신적 증가로 특징지어지고 조직학적으로는 결체조직 성분의 축적, 특히 교원질섬유의 축적을 보여준다. 그러나 이런 증가된 교원질양이 치은섬유모세포의 증가된 수, 교원질생산의 과다, 교원질파괴의 감소, 또는 이런 모든 요인들의 복합에 의한것인지는 명확하게 알려지지 않았다^{6~9)}. 이 점을 명확히 하기위해 Hall 과 Squier⁶⁾ 등은 구서의 치은에 대한 연구를 전자현미경으로 시행한 결과 phenytoin에 의해 야기된 치은과증식이 기저물질의 증가에 의한 것으로 결론지었다. Phenytoin에 의해 야기되는 과증식된 조직으로부터 배양된 치은섬유모세포는 기저물질의 한 성분인 glycosaminoglycans의 증가된 양을 방출하고^{10), 11)} 또한 불활성 collagenase의 양을 증가시켜서 교원질을 분해할 수 없게 하고¹²⁾ 최근에 nifedipine에 의한 치은과증식을 야기하는 주요인자로 알려진 androgen metabolism를 증가시킨다고 하였다¹³⁾.

Dahllof 등은 그들의 생화학적 연구¹²⁾와 혈청학적 연구¹⁴⁾에서 건강한 생검표본과 비교할 때 phenytoin에 의해 야기된 과증식된 치은에서 비교원질성 기질의 증가와 교원질성 기질의 감소를 발견하였다고 하였다. Narayanan 등은 phenytoin에 의해 야기된 치은섬유모세포는 정상적인 대조군으로부터의 세포들보다 더 많은 교원질을 생산하였고 더 높은 collagen mRNA level을 보였다고 보고하였다³⁶⁾. Benveniste 과 Bitar는 배양한 치은섬유모

Table 3 Effect of nifedipine on total protein synthesis and percent collagen synthesis of human gingival fibroblast

Concentration	0	100	200
TPS	2412.38±209.50	1408.18±104.19*	1830.01±140.98*
PCS	13.45±2.07	12.09±2.29	8.91±1.30*

TPS(total protein synthesis) : Data were expressed as mean(dpm)±S.D.

PCS(percent collagen synthesis) : Data were expressed as mean(%)±S.D.

* : Statistically different from the control value(p< 0.05)

세포에서 단백질과 mRNA 생합성에서 phenytoin의 증식효과를 보고하였다³⁷⁾. Vernillo 과 Schwartz는 또한 phenytoin이 배양된 인간의 치은섬유모세포에서 교원질 축적을 자극한다고 보고하였다³⁸⁾. Watson과 Siegel 그리고 Watson과 Dowd는 phenytoin이 타액선의 microsomes내로의 칼슘이온의 부착을 저해한다고 보고하였다^{39, 40)}. Pincus와 Lee 그리고 Pincus과 Hsiano은 phenytoin이 synaptosomal calcium uptake와 efflux모두를 저해한다고 보고하였다^{41, 42)}. Colombani등은 intracellular Ca²⁺와 calmodulin의 상호작용을 방해하는 cyclosporin A의 가능성에 대해 기술하였다⁴³⁾.

그러나 본 연구에서는 nifedipine이 정상적인 인간의 치은섬유모세포에서 세포증식도는 물론 단백질과 교원질합성을 증가시키는 능력이 없고 오히려 감소시키는 것으로 나타났다. 이런 결과는 약제에 의한 치은과증식의 발생에 있어서 환자들이 responder와 non-responder로 구분되어진다는 이전의 결과들과 Salo의 실험결과^{12, 16)}와도 일치한다. 결론적으로 어떤 nifedipine투약도 받지 않은 건강한 사람으로부터 채취한 치은섬유모세포는 그 개체가 nifedipine에 반응성을 보여 치은과증식을 야기하는지의 여부가 불확실하므로 실험실상으로 nifedipine을 투여하는 경우에 nifedipine에 반응하는 경우인 responder 또는 반응하지 않는 경우인 non-responder로 나눌 수 있을 것이다.

따라서 우리의 실험에 사용된 치은섬유모세포는 nifedipine에 대한 non-responder로 사료된다.

Fuji와 Matsumoto등의 실험에 의하면 nifedipine에 반응하는 환자들로부터 채취한 치은섬유모세포의 배양물들은 (calcium-channel blockers 또는 phenytoin존재하에서 배양)비반응성의 환자들의 치은섬유모세포보다 고도의 증식도, 더 많은 DNA합성과 교원질

합성의 경향을 보여주었다⁵⁾.

Nifedipine이 세포막내의 칼슘통로를 서서히 막는다는 것은 잘 알려져 있다. 위에서 기술했듯이 그외의 calcium-channel blockers 즉, diltiazem, verapamil 그리고 nicardipine 또한 치은과증식을 야기한다. 비록 이런 약제들이 다른 기전에 의해 작용하지만 치은과증식을 야기하는 그들의 능력은 calcium-channel blocking effects와 관련되어 있다. 또다른 중요한 점은 반응성의 환자로부터의 치은섬유모세포가 다른 calcium-channel blockers 즉, diltiazem, verapamil, nicardipine 그리고 phenytoin에도 또한 감수성이 있다는 것이다. 따라서 nifedipine복용 때문에 치은과증식을 야기하는 환자들은 다른 calcium-channel blockers에 대해서도 치은과증식을 유발할 수 있을 것이다.

우리들은 세포배양이 임상적 상황을 실제로 반영하지 않는다는 사실을 알고 그 결과를 해석하는데 주의해야 한다. 예를들면, 과증식은 염증존재시 더욱 뚜렷하고 치은절제술후의 조심스런 구강위생조절은 그 반응을 감소시킬 것이기 때문이다. 다양한 매개체들이 섬유모세포 활성화, 기질의 침착과 분해에 큰 영향을 끼친다는 것은 잘 알려져 있고 현재에는 그런 매개체들 중의 하나가 세균에 의해 자극되는 염증세포에서 생산되며 또 교원질합성을 증가시키는 interleukin-1으로 알려졌다. In vivo에서의 염종의 존재는 세포배양에서 사용되는 약제가 치은과증식의 병인론에 대해 왜 불일치의 결과를 가져오는가에 대한 이유가 된다. 따라서 약제와 같이 자극/염증성 인자의 역할에 대해 더 연구되어야 할 것이다.

V. 결론

정상적인 인간의 치은섬유모세포에 100 및 200ng/ml의 nifedipine을 첨가하여 10일간 배

양한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 100 및 200ng/ml의 nifedipine을 투여하여 1, 3, 5, 7 및 10일째에 cell counting과 MTT assay를 시행한 결과 실험실상의 nifedipine투여는 정상적인 치은섬유모세포의 증식에 영향을 미치지 않는것으로 관찰되었다.
2. 10일간의 cell counting에 의한 세포증식의 양상은 대조군과 100ng/ml의 nifedipine을 투여한 경우는 7일째에 최대의 증식도를 보이다가 서서히 감소하는 경향을 보이고, 200ng/ml의 nifedipine에 배양한 군은 10일째에도 계속 증가되는 세포증식 양상을 보였다.
3. 건강한 치은섬유모세포에 100 및 200ng/ml의 nifedipine을 투여하여 7일간 배양한 후 치은섬유모세포의 총 단백질 합성을 측정 한 결과 100, 200ng/ml의 nifedipine에 배양한 군은 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 보였다.
4. 건강한 치은섬유모세포에 대한 7일째의 교원질 합성능 실험에서는 200ng/ml의 nifedipine을 투여한 경우에서 통계학적으로 유의한 감소를 보였고, 100ng/ml의 nifedipine의 경우에서도 비록 통계학적인 유의성은 없었으나 약간의 감소가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합할 때 건강한 치은섬유모세포에 대한 실험실상의 nifedipine의 투여가 세포증식도, 총단백질 합성 그리고 교원질 합성을 자극시키는 작용이 없는것으로 생각된다.

참고문헌

1. Pihlstrom BL, Carlson JF, Smith QT, Bastein SA, Keenan KM. Prevention of phenytoin associated gingival enlargement-A 15-month longitudinal study. J

- Periodontol, 51, 311-317, 1980.
2. King DA, Hawes RR, Bibby BG. The effect of oral physiotherapy on dilantin gingival hyperplasia. Report of case. J Oral Pathol, 5, 1-7, 1976.
3. 최종길. The effects of nifedipine on the activity of human gingival fibroblast. The Journal of Korean Academy of Peridontology, 3, 622-633, 1993.
4. Brown RS, Beaver WT, Bottomley WK. On the mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. J Oral Pathol Med, 20, 201-209, 1991.
5. A. Fuji, H. Matsumoto, S. Nakao, H. Teshigawara and Y. Akimoto. Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders. Archs oral Biol. Vol. 39, No. 2, 99-104, 1994.
6. Hall, B.K., and Squier, C.A. Ultrastructural quantitation of connective tissue changes in phenytoin-induced gingival overgrowth in the ferret. J Dent Res, 61, 942-952, 1982.
7. Ebadi, M.S., and Scott, P.M. Increase in collagen level by diphenylhydantoin (Dilantin)gingival hyperplasia : drug-induced abnormality of connective tissue. Proc Natl Acad Sci USA, 73, 2090-2099, 1976.
8. Rose, G. G., and Robertson, P. B. Collagenolysis by human gingival fibroblast cell lines. J Dent Res, 56, 416-424 , 1977.
9. Goultshin, J., and Shoskan, S. Inhibition of collagen breakdown by diphenylhydantoin. Biochem Biophys Biophys Acta, 631, 188-

- 191, 1980.
10. Kantor, ML., Hassel, TM. Increase accumulation of sulfated glycosaminoglycans in cultures of human fibroblasts from phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Dent Res*, 62, 383-387, 1983.
 11. Dahllof G, Modeer T, Reinholt FP, Wikstrom B, Hjerpe A. Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol Res*, 21, 13-21, 1986.
 12. Hassel TM. Evidence for production of an inactive collagenase by fibroblasts from phenytoin-enlarged human gingivae. *J Oral Pathol*, 11, 310-317, 1982.
 13. Sooriyamoorthy M, Gower DB, Eley BM. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. *J Periodont Res*, 25, 25-30, 1990.
 14. Dahllof G, Reinholt FP, Hjerpe A, Modeer T. A quantitative analysis of connective tissue component in phenytoin-induced gingival overgrowth in children. A stereological study. *J Periodont Res*, 19, 401-407, 1984.
 15. D.A. Tipton, H. R. Fry, M. Kh. Dabbous. Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodont Res*, 29, 401-409, 1994.
 16. Salo T, Oilarinen KS, Oilarinen AL. Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med*, 19, 404-407, 1990.
 17. Robert M, Lucas, Lydia P. Howell and Brian A. Wall. Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A Histochemical and ultrastructural study. *J Periodontol*, April, 211-215, 1985.
 18. Pihlstrom BL, Carlson JF, Smith QT, Bastein SA, Keenan KM. Prevention of phenytoin associated gingival enlargement-A 15-month longitudinal study. *J Periodontol*, 51, 311-317, 1980.
 19. Nishikawa S., Ueno A., Ishida H., Nagata T., Hamasaki A., Koda N., Kido J. and Wakano Y. Studies on gingival hyperplasia induced by nifedipine-effects of nifedipine and EGF on cell proliferation in human gingival fibroblasts. *Jap J Periodont*, 28, 168-175, 1986.
 20. Nishikawa S., Tada H., Hamasaki A., Kasahara S., Kido J., Nagata T. Nifedipine induced gingival hyperplasia : a clinical and in vitro study. *J Periodont*, 62, 30-35, 1991.
 21. Hassell T. M. and Sobani S. Effects of dihydropyridines on connective tissue cells in vitro. *J dent Res*, 66, 282, 1987.
 22. Peterkofsky B, and Diegelmann R. Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochem*, 10, 988-994, 1971.
 23. Barclay S., Thomason J. M., Idle J. R. and Seymour R. A. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. *J. Clin Periodont*, 19, 311-314, 1992.
 24. Girgis S. S., Staple P. H., Miller W. A., Sedransk N. and Thompson T. Dental root abnormalities and gingival overgrowth in epileptic patients receiving anticonvulsant therapy. *J. Periodont*, 51, 474-482, 1980.

25. Glickman I. and Lewitus M. P. Hyperplasia of the gingivae associated with dilantin therapy. *J. Am dent Ass*, 28, 199-207, 1941.
26. Lundstrom A., Eeg-Olofsson O. and Hamp S. E. Effects of anti-epileptic drug treatment with carbamazepine or phenytoin on the oral state of children and adolescents. *J Clin Periodont*, 9, 482-488, 1982.
27. Lenderman D., Lumerman H., Reuben S. and Freedman P. D. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. *Oral Surg*, 57, 620-622, 1984.
28. Katsum. Y., Takahara M., Watanabe Y., Muto T., Atsuta F., Tsuchiya H., Hanazawa Y., Takahashi K., Uchiyama S., Kanazawa H. and Sato K. Statistical study of incidence of gingival hyperplasia induced by hypotensive drugs. *J Jap Stomat Soc*, 40, 169-178, 1991.
29. Seymour R. A. Calcium channel blockers and gingival overgrowth. *Br dent J*, 170, 376-379, 1991.
30. Barak S., Engelberg I. S. and Hiss J. Gingival hyperplasia caused by nifedipine. *Histopathologic findings. J Periodont*, 58, 639-642, 1987.
31. Syrjanen S. M. and Syrjanen K. J. Hyperplastic gingivitis in a child receiving sodium valporate treatment. *Proc Finn Dent Soc*, 75, 95-98, 1979.
32. Rateitschak-Pluss E. M., Hefti A., Loryscher R. and Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in mam. *J clin Periodont*, 10, 237-246, 1983.
33. Colvard M. D., Bishop J., Weissman D. and Gargiulo A. V. Cardizem induced gingival hyperplasia : a report of two cases. *Periodont Case Rep*, 8, 67-68, 1986.
34. Cucchi G., Giustiniani S. and Robustelli F. Gingival hyperplasia caused by verapamil, *Italian J Cardiol*, 15, 556-557, 1985.
35. Nagano S., Ogawa T., Fukuyama S., Nishimura T., Shiratori Y., Ukada S., Shimizu K., Inaba A., Sekine F., Takayama K. Influence of nifedipine hydrochloride on hypotensive diabetic mellitus. *Jap Pharmac Ther*, 19, 5309-5313, 1985.
36. Hassell T. M. and Cooper G. C. Phenytoin-induced gingival overgrowth in mongrel cat model. *Raven Press New York*, 147-162, 1980.
37. Benvensite K. and Bitar M. Effects of phenytoin on cultured human gingival fibroblasts. In *Phenytoin-induced teratology and Gingival Pathology*. Raven Press, New York, 199-213, 1980.
38. Vernillo A. T. and Schwartz N. B. The effects of phenytoin(5, 5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. *J. Periodont res*, 22, 307-312, 1987.
39. Watson E. L. and Siegel I. A. Diphenylhydantoin effects on salivary secretion and microsomal calcium accumulation and release. *Eur. J. Pharmac*, 37, 207-211, 1976.
40. Watson E. L. and Dowd F. Diphenylhydantoin: effect of amylase release, cyclic nucleotides and ion efflux in mouse parotid acini. *Eur. J. Pharmac*, 88, 153-160, 1983.
41. Pincus J. H. and Lee S. H.

- Diphenylhydantoin and calcium: relation to norepinephrine release from brain slices. *Archs Neurol.* 29, 239-244, 1973.
42. Pincus J. H. and Hsiano K. Phenytoin inhibits both synaptosomal ^{45}Ca uptake and efflux. *Expl Neurol.* 74, 293-298, 1981.
43. Colombani P. M., Robb B. and Hess A. B. Cyclosporin A binding to calmodulin : a possible site of action on T-lymphocytes. *Science.* 228, 337-339, 1985.

The Effects of Nifedipine on Cellular Activity of Human Gingival Fibroblast

Hyung-Shik Shin*, Hee-Ran Han*, Myung-Eun Kim**,

*Department of Periodontology, School of Dentistry

**Department of Biology, Wonkwang University.

Gingival overgrowth is a well known side effect of several drugs, including nifedipine, phenytoin, cyclosporin, diltiazem, verapamil. A number of studies have been performed to investigate the mechanism by which nifedipine (a calcium channel blocking agent) affects the gingival tissue. The aim of the present work was to investigate the effect of nifedipine on healthy gingival fibroblasts with special emphasis on determining the changes in cellular proliferation and protein and collagen synthesis.

Gingival fibroblasts were obtained from the explants of healthy gingiva of extracted 3rd molars or premolar teeth extracted from the patients for orthodontic treatment. To evaluate the effect of nifedipine on cell proliferation, the cells were seeded at a cell density of 1×10^4 cells/well in 24-well culture plates and treated with 100 and 200 ng/ml of nifedipine for 10 days. After trypsinization, the cells were counted with a haemocytometer on 1st, 3rd, 5th, 7th and 10th days. Then, MTT assay was carried out. For total protein and percent collagen synthesis, $3 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -proline was added to each well for the final 4 hours of the incubation period. The results indicate that nifedipine does not influence cell proliferation in healthy gingival fibroblast in vitro and has a specific effect in reducing total protein and percent collagen synthesis.

On the above the findings, exogenous nifedipine does not influence on healthy human gingival fibroblast proliferation and protein and collagen synthesis.