저염식으로 유도한 Cyclosporine 신독성 백서에서의 치은 변화

임재계 · 김용진[1] · 박용훈[2]

경북대학교치과대학구강병리학교실
영남대학교의과대학병리학교실[1], 소아과학교실[2]

I. 서론

Cyclosporine(CsA)은 골수억제 작용은 없이 helper T 임파구에만 작용하여 interleukin-2의 생성을 억제함으로써, 감염에 대한 방어 기전은 유지되면서 거부반응을 억제함으로써 장기이식의 성공률을 크게 향상시켰다. 그러나, 장기간 혹은 과다 사용시에는 신독성, 간독성, 빈혈, 다모증 등의 부작용이 나타나고 있어서 그 사용에는 아직도 주의를 요한다[1]. 이러한 전신적 부작용 외에 치과 영역에서는 CsA 장기 투여로 인한 치은의 비후가 심각한 문제이다.

CsA에 의한 치은 비후의 정도는 CsA의 농도가 높을수록[2-4], 치석이나 치은염이 심할수록 그 정도가 심하다고 한다[2]. 조직검사에서 치은에서 임파구 및 형질세포가 많음을 알게 되었고[5] 임파구의 대부분은 T임파구임이 증명되었다[6]. 이러한 결과는 CsA가 치은상피세포에 침착하여 염증세포의 침윤을 유발함으로서 이차적으로 치은 비후를 야기시킬 것으로 생각하고 있다[5,6]. 그러나 동물실험에서는 이러한 염증세포의 침윤에 대한 언급은 없어서 이러한 기전의 설명에는 다소 부족한 점이 있다[7].

지금까지의 동물실험은 CsA에 의한 신독성 실험 model과 대체로 유사하여 CsA를 25㎎/kg로 흰쥐에 경구, 복강주사, 피하주사 및 근육주사 등으로 4 6주간 투여하는 방법을 쓰고 있다[8-10]. 그러나 이 방법이 신기능 저하는 초래하지만 신소동맥의 병변이나 신피질 간질의 섬유화 등 인체의 신독성에서 보이는 조직학적 변화들은 뚜렷하지 못하다는 단점이 지적되고 있다[8-10]. 이에 반하여 1995년 Young 등[11,12]은 흰쥐에게 저염식을 시키면서 CsA를 투여한 결과 인간에서 보인 신독성과 같은 현저한 섬유화를 재현시켰다. 따라서 현재는 이 model이 CsA 만성 신독성의 기준이 되는 실험방법으로 제안되었다.

이 실험에서 신피질의 섬유화는 CsA로 야기된 혈관수축에 의한 일종의 허혈상태에 따른 이차적 변화로서, 주변의 섬유모세포나 침윤된 단핵세포에서 분비된 TGF-β의 활성화에 의한 것으로 설명하고 있다[13,14]. 따라서 치은의 비후도 신장기능 및 형태학적인 변화와 TGF-β활성화 정도에 따라 어떻게 변할 것이며 그에 따른 병리기전의 설명이 필요하다고 할 수 있다.

저자들은 일반 사료를 먹인 실험군과 저염식을 먹인 실험군에서 CsA를 동일 양, 동일 기간 동안 투여하여 신장에 독성소견이 나온 것을 확인 후에 치은의 비후를 관찰하여, 양자를 비

교함으로써 그 발생기전 특히 TGF-β활성도와 저염식에 따른 상관관계를 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 한국과학 기술 연구원 부설 생명공학 연구소에서 무균 사육하여 월령 30일 정도의 이유가 끝난 체중 100 130gm Fisher 344 수컷 흰쥐를 사용하였다. Fisher 344 수컷 흰쥐는 면역학적 작용에 민감하여 이러한 실험에 널리 쓰이고 있으며, Adachi 등[15]은 CsA에 의한 치은 변화 실험에서 100% 치은 비후가 생겼다는 보고하여 이 쥐를 선택하였다. 또한 어린 쥐가 나이든 쥐보다 치은 비후가 잘 생긴다는 보고[16,17]에 따라 어린 쥐를 선택하였다.

2. 시료 및 약제

실험에 사용한 정상 식이는 0.4% sodium이 함유된 분말 사료를, 저염식은 0.05% sodium이 함유된 Teklad사(Teklad Premier, Madison, U.S.A.) 제품을 사용하였다.

실험에서 CsA은 종근당에서 개발한 microemulsion형태의 Cypol-N(25㎎/capsule)을 사용하였다. 용량은 사료 1g당 300㎍의 CsA를 혼합하여 투여하였다. 이 용량은 체중이 100 130g 정도의 쥐가 하루 약 10 15g의 사료를 먹는 것을 확인한 후에 체중 1kg당 CsA가 20 30㎎ 투여 될 수 있는 양으로 하였다[8-10].

3. 사육방법

제공받은 흰쥐를 정상 식이의 분말 사료에 1주일간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 실험군은 다음과 같이 분류하였다.

· 제1군: 정상 식이의 대조군으로서 분말사료 1g당 올리브 기름 300㎕를 섞어서 먹인 군 (Normal standard diet; NSD).
· 제2군: 정상 식이에 분말사료 1g 당 CsA 300㎍을 섞어서 먹인 군 (NSD+CsA).
· 제3군: 저염식에 분말사료 1g 당 올리브 기름 300㎕를 섞어서 먹인 군 (Low salt diet; LSD).
· 제4군: 저염식에 분말사료 1g 당 CsA 300㎍을 섞어서 먹인 군 (LSD+CsA).

각각의 군에 6마리씩 분배하였으며 1 4군까지 각각 1마리씩 짝을 지어 하루에 먹는 사료양을 관찰하면서 동일 양을 먹도록 조정하여 6주간 사육하였다. 물은 정상적으로 먹도록 하였다.

4. 검사물 채취 방법

6주 후 각 군을 ether로 마취하고 복강을 열어 대동맥이 좌우 대퇴동맥으로 분지되는 곳에서 전혈을 채취하고 신장 및 하악을 적출하였다.

5. 생리학적 검사법

혈청 creatinine과 Na^+, K^+는 자동화학분석기(Hitachi 764, Japan)을 이용하여 측정하였다.

CsA의 혈중 농도는 전혈을 이용하여 Abbott사(U.S.A)의 monoclonal 전혈 분석법인 fluorescence polarization immunoassay(FPIA)에 의해 정량화 하였다. FPIA는 mouse monoclonal anti-CsA항체와 fluorsescein-labeled CsA를 이용하는 측정 kit 와 TDxFLx 분석기(Abbott, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

사구체 여과율은 흰쥐의 복강으로 200μCi (0.5cc)의 diethylene triamine penta acetic acid(DTPA)를 주사하고 정확히 60분 후 복부 대동맥의 분지부에서 혈액을 채취하여 혈장만 분리한 후 γ-counter로 cpm을 측정하였다.

측정식은 다음과 같이 하였다.

☞ **GFR = (V/t) x $\log_n$(P_0/P_t)**

V = 0.264BW - 1.92 x $10^{-4}$$BW^2$ + 1.03

P_0 (cpm/ml) = I (cpm)/V(ml)

P_t (cpm/ml) : cpm of plasma

BW : body weight

I : cpm of control

t : time

6. 신장조직 표본 제작법

적출한 신장조직은 10% 중성 포르말린과 Histochoice®(AMRESCO, U.S.A.)가 포함된 고정액에 고정한 후 통상적인 방법으로 탈수 및 파라핀에 포매하여 2㎛ 두께로 박절하여 PAS(Periodic Acid - Schiff)염색을 시행하여 관찰하였다.

7. 치은 표본 제작 및 두께 측정법

하악은 적출전 전치부위의 사진을 찍고 알지네이트 인상을 채득한 후 적출하였다. 적출 후 대구치 부위를 사진 촬영한 후 신장조직에 사용한 같은 용액에 고정하였다. 하루를 고정한 후에 주변 연부조직을 잘 박리하여 어금니 부위만 1% 질산을 함유한 탈회용액에 하루 밤 탈회한 후 충분히 탈회되었음을 확인한 후 1번 대구치의 정중앙을 관상봉합방향(coronal)으로 절단하여 통상적인 조직 처리 방법에 따라 4㎛으로 박절하여 H&E 염색을 시행하여 관찰하였다.

치은의 두께는 하악 전치부 및 대구치의 두 곳에서 측정하였다. 전치부는 채득한 인상으로 제작한 석고모형을 이용하여 Fu 등[18]의 방법에 의해 하악의 전치부의 유두치은에서 협설폭(buccolingual; BL)과 수직적 고경(vertical height; VH)과 근원심폭(mesiodistal; MD)을 측정하였다.

쥐의 전치는 법랑아 모세포가 계속 남아 있어서 성장이 지속됨으로 사람과 다를 가능성이 있음으로 대구치를 선택하여 다시 조직학적으로 측정하였다. 또한 설측 부위보다 협측 부위의 치은이 더욱 뚜렷하게 비후된다는 보고에[19] 따라 협측 부위를 측정의 대상으로 삼았다. 현미경에 drawing apparatus (Olympus, Japan)를 달아서 관찰할 표본으로 10배에서 그림을 그린 후 대구치를 덮고 있는 부위 중 가장 두꺼운 곳을 골라서 한쪽 상피세포의 표면에서 반대편 치은의 상피 표면까지를 측정하였다. 동일한 검사자에 의한 계측치의 재현성 검증을 위해서 각각 다른 날 1회씩 총 3회에 걸쳐 측정하여 그 차이를 검정한 결과 측정치간에 유의한

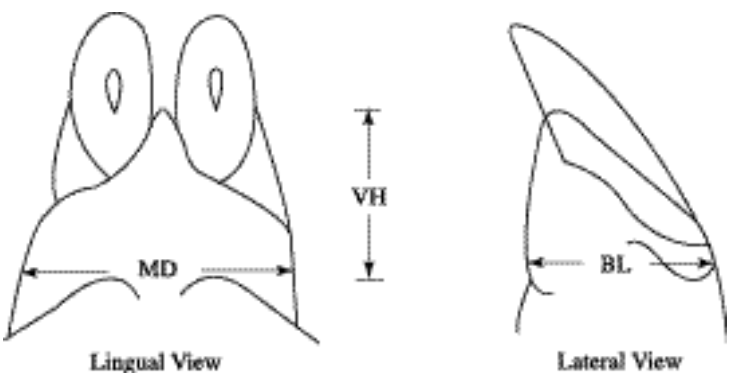

Figure 1. Measuring sites for thickness of gingiva at incisor.
(MD: mesidodistal, VH, vertical height, BL: buccolingual)

차이가 나타나지 않았음을 확인하였다.

8. 면역조직화학적 검사

TGF-β1의 면역조직화학적 검색을 위하여 파라핀에 포매된 신장 및 하악 대구치 부위의 조직절편을 Probe-on-Plus(Fischer Scientic Co., U.S.A.) 유리 슬라이드에 4㎛ 두께로 박절하여 붙인 후 모세관 원리를 이용한 Microprobe system(Fischer Scientic Co., U.S.A.)으로 염색하였다. Xylene와 Histoclear를 1:3으로 섞은 용액에 적시고 80℃의 열을 가하는 과정을 4회 반복하여 탈랍과정을 거친 후 95% 알콜과 100% 알콜에서 탈수하였다. 내재성 peroxidase를 억제하기 위해 endoblocker에 반응시킨 후 조직항원이 잘 노출되게 pepsin용액으로 전처치를 하고 1X immuno/DNA buffer로 세척하였다. 일차항체로는 rabbit anti-human TGF-β1 polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)를 antibody diluent로 1: 50 배율로 희석하여 2μg/mℓ의 농도로 4℃의 수조에서 하룻밤동안 반응시켰다. Biotin이 결합된 이차항체를 가한 후 실온의 수조에서 1시간 반응시키고 strep-tavidin HRP conjugate로 표식하고 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC) chromogen 용액으로 발색하였고 Harris hematoxylin으로 약 20초 동안 대조 염색하여 glycerol 봉입제로 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

9. 통계학적 검증

Table 1. Change in serum creatinin, Na^+, K^+ and CsA level after 6 weeks treatment of CsA

	Serum Cr(㎎/dl)	Na^+(mEq/l)	K^+(mEq/l)	CsA level(μg/ml)
NSD	0.5±0.1	146.0±0.8	4.4±0.7	0.07±0.04
NSD+CsA	0.6+0.1	142.6±1.5	4.4±0.5	2.0±1.4
LSD	0.4±0.1	142.5±1.3	4.6±0.2	0.06±0.02
LSD+CsA	0.7±0.1	141.3±1.5	4.9±0.4*	2.8±1.6

* p<0.05: compared with NSD+CsA

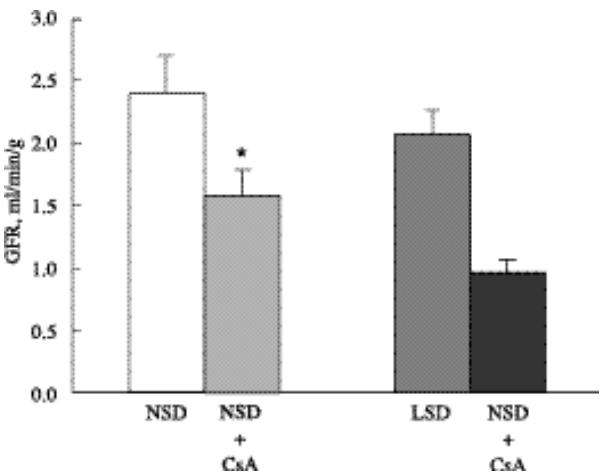

Figure 3. Comparison of glomerular filtration rate in normal salt diet and low salt diet rats with olive oil or CsA of 6 weeks
***p<0.05: compared with NSD and LSD**

통계적 분석은 SPSS를 이용한 Wilcoxon's rank sum test 혹은 independant - samples T - test를 이용하였고 실험자료는 평균±표준편차로 표시하였으며 0.05 혹은 0.1 이하일 경우를 통계적으로 의의가 있는 것으로 판정하였다.

III. 연구성적

1. 육안적 소견(Figure 2)

육안적으로 CsA 투여군에서 치간 유두의 현저한 증식이 보이고 전치부가 증식된 치은에 밀려서 원심 이동되고 치간 접촉부가 벌어졌다. 저염식군에서 치은의 증식이 심하지 않았다. 대구치를 둘러싸고 있는 치은도 비후되어 있었으며 협측 부위가 설측 부위보다 더 뚜렷하였다.

2. 생리학적 검사성적(Table 1)

Serum creatinine: NSD과 LSD에서는 정상적이었으나 CsA를 투여한 군에서는 모두 상승하였다. 그러나 식이에 따른 차이가 없었다.

Serum Na^+: CsA를 투여한 군에서나 투여하지 않은 군에서 모두 차이가 없었다. 특이 저염식을 한 군에서도 혈중 Na^+의 농도는 차이가 없었다.

Serum K^+: CsA를 저염식으로 투여한 군에서 유의하게 상승하였다($P<0.05$) .

혈중 cyclosporine 농도: 저염식을 한 경우에도 혈중 CsA의 농도에는 변함이 없었다.

3. 사구체 여과율(Figure 3)

NSD에서는 2.4±0.3㎖/min/g, NSD+CsA에서는 1.6±0.2㎖/min/g, LSD에서는 2.1±0.2㎖/min/g, LSD+CsA에서는 1.0±0.1㎖/min/g이었다. 즉, 정상식이나 저염식이만으로는 사구체 여과율을 떨어뜨리지 않는데 비하여 CsA에 의한 사구체 여과율 감소는 저염식을 하였을 경우에 더욱 현저하였다.

4. 신장의 조직학적 및 면역조직화학적 검사 소견(Table 3, Figure 4, 5)

NSD과 LSD에서는 정상적인 사구체와 세뇨관으로 구성되어 있었다. 특히 LSD에서는 혈관의 초자화나 간질의 섬유화 등은 보이지 않았다. NSD+CsA에서는 약 10%의 간질에서 경한 섬유화와 단핵구의 침윤이 인정되었으며 그에 따른 약한 정도의 세뇨관의 위축이 인정되었다. 그러나 세뇨관 상피세포에서는 PAS 양성의 작은 과립들이 관찰되었다. LSD+CsA

Table 2. The thickness of gingiva at incisor and first mandibular molar in normal salt diet and low salt diet rats with olive oil or CsA of 6 weeks.

	Incisor			Molar (㎜)
	MD	VH	BL	
NSD	2.93±0.12	2.84±.0.31	1.69±0.21	1.13±0.20
NSD+CsA	3.09+0.20	3.78±0.26*	2.62±0.24	3.45±0.78*
LSD	2.85±0.35	2.72±0.30	1.85±0.28	1.42±0.37
LSD+CsA	3.21±0.40	3.51±0.25†	2.55±0.17	2.51±0.67††

MD: mesidodistal, VH: vertical height, BL: buccolingual for incisor gingiva
Molar: thickness of buccal side of gingiva at first mandibular molar.
* $p< 0.05$ compare with NSD or LSD
† $p< 0.1$ compare with NSD+CsA
†† $p<0.05$ compare with NSD+CsA

Table 3. Summary of microscopic findings of kidney and gingiva in normal standard diet and low salt diet rats with olive oil or CsA of 6 weeks

	Control	NSD+CsA	LSD+CsA
Kidney			
*Interstitial fibrosis	○	●	●●●
*Mononuclear cell infiltration	○	●	●●●
*Arteriolopathy	○	●	●●●
*TGF - β_1	●	●●	●●●
Gingiva			
*Surface epithelium thickness	●	●●●	●●
*Rete ridge elongation	○	●●●	●●
*Submucosal stromal fibrosis	●	●●●	●●
*Vascular proliferation	○	●●●	●●
*Vascular dilatation	●	●●●	●●
*TGF - β_1	●	●●●	●●

○: Absent, ●: mild, ●●: moderate, ●●●: severe

에서는 이러한 소견들이 더욱 현저하였으며 그 범위도 확장되었다. 특히 세동맥들의 초자화가 뚜렷하여서 사람에서의 만성 CsA 신독성의 소견과 흡사하였다.

TGF - β_1 면역조직화학적 검사에서 NSD과 LSD에서는 근위 신세뇨관 상피세포의 세포질의 일부에서만 양성으로 나왔을 뿐 전반적으로 음성의 소견이었다. NSD+CsA에서는 상피세포의 세포질에서의 양성 반응은 더욱 뚜렷하였고 섬유화가 보이는 간질부위와 그곳에 있는 섬유모세포 및 임파구 등에서 양성 소견이 보였다. LSD+CsA에서는 이의 소견이 더욱 뚜렷하고 양성 부위도 넓어졌다. 또한 초자양 변화를 보인 세동맥 벽에서 강한 양성을 보였다(Figure 4).

5. 치은의 두께변화(Table 2, Figure 6, 7)

전치부 치은을 세 방향에서 측정한 결과 NSD와 LSD에서는 세 방향 모두 차이가 없었다. CsA를 투여한 결과 정상 식이와 저염식에 관계없이 치은이 VH 및 BL 폭이 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 그러나 MD로는 차이가 없었다. NSD+CsA와 LSD+CsA의 비교에서는 VH가 저염식 군에서 그 증식이 저하되었음을 알 수 있었다($p<0.1$). 그러나 MD와 BL에서는 그 차이를 알 수 없었다.

대구치 협측에서의 치은 두께에서도 저염식이 영향을 미치지 않음을 알 수 있었고 CsA 투여군에서는 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$). NSD+CsA와 LSD+CsA의 비교에서는 저염식군에서 그 증가가 현저히 줄었음을 알 수 있었다($p<0.05$).

6. 치은의 조직학적 및 면역조직화학적 검사 소견(Table 3, Figure 6, 7, 8)

NSD 및 LSD에서는 비슷한 양상을 보였다. 상피세포는 약 10층으로서 납작하였고 rete ridge의 형성은 보이지 않았다. 상피하의 기질에는 결체 조직이 느슨하게 배열되어있고 가끔씩 섬유모세포가 관찰되었다. NSD+CsA에서는 상피세포의 층이 최고 17층까지 증가된 곳도 나타났으며 rete ridge가 형성되어 아래쪽으로 자라져 나왔다. 기질에는 결체 조직이 다소 치밀하게 배열되어있고 모세혈관이 증식 및

확장되어 있었다. 섬유모세포의 수가 증가되었으며 단핵구의 침윤도 관찰되었다. 이러한 소견들은 LSD+CsA에서도 관찰되었으나 그 정도는 훨씬 덜 하였다. 모세혈관의 증식이 뚜렷하지 않았고 확장의 정도도 미미하였다.

표면조직화학검사에서 NSD+CsA에서는 기질의 섬유모세포와 단핵구들에서 강한 양성을 보였으며 표면의 상피세포들의 세포질에서도 약양성을 보였다. LSD+CsA에서는 이러한 정도가 모두 약해져서 기질에 흩어져 있는 섬유모세포들에서 양성으로 나왔다.

IV. 고찰

CsA 장기투여에 의한 치은의 비후는 CsA의 투여용량, 혈청 내 농도, 투여기간 등에 따라 신이식 환자의 10 70%까지 경험하는 중요한 부작용으로서[20] 구강 및 치아의 건강에 중대한 위해를 가하고 있으나 아직도 그 기전에 대하여서는 분명히 밝혀지지 않고 있다. 특히 CsA를 인슐린 의존성 당뇨병, Bechet 증후군, 건선 등 자가 면역질환의 치료제로서도 널리 쓰이고 있어서 치은의 부작용은 신독성과 더불어 중요한 부작용으로 대두되고 있다.

1995년 Young 등[11]은 저염식을 이용하여 세동맥 혈관 변화가 뚜렷하고 따라서 간질의 섬유화도 더욱 분명한 새로운 CsA 신독성 모델을 개발하였다. 이 모델은 많은 연구자들로부터 사람에서의 만성 CsA 신독성의 조직학적 현상과 비슷함을 인정받아 가장 신뢰받는 실험모델이 되었다. 따라서 CsA에 의한 치은 비후의 기전을 알아보기 위한 실험도 종래의 정상식이로 키운 흰쥐에 CsA를 투여하는 방법과 저염식을 통한 실험에 의한 것을 비교하는 것이 보다 합리적인 결과를 얻을 것으로 생각한다.

연구자들은 Young 등[11]이 고안한 실험법으로 CsA를 흰쥐에 장기 투여하여 첫째, CsA는 신장의 손상 그리고 치은의 비후를 야기시키는 특징이 있으나 저염식과 함께 투여할 경우 신장의 손상은 증가되지만 치은의 비후는 반대로 줄어진다는 사실을 알게 되었다. 둘째, 신기능이 나쁜 경우와 치은 비후의 정도와는 비례하지 않았다. 셋째, 치은의 비후에 염증세포의 침윤은 심하지 않았다. 넷째, TGF-β_1의 활성화 정도가 치은 비후에 직접적 영향을 미치고 있었다.

CsA 신독성 실험에서 저염식이 더 심한 변화를 일으키는 원인에 대해서는 저염식이가 신장의 renin-angiotensin 계통을 활성화시킴으로써 혈관의 변화가 증가되어서 일어난다고 설명한다. 즉 이 계통의 활성화가 신장 내에 혈행의 저항을 올리고 장기간 지속되면 혈관에 초자양 변화를 일으키게 된다[11]. 따라서 좁아진 혈관들로 인해서 허혈성 변화는 더욱 심하여진다. 실지 이들의 실험에서 renin 소과립이 사구체 구심성 세동맥 벽에서 증가됨을 전자현미경으로 관찰하였고[11] enalapril 등의 angiotensin변환 효소 방지제를 사용하거나[21-23] 그 수용체를 차단하는 losartan을 사용하여 CsA 독성 현상을 줄인 보고[24-26]등이 이들의 주장을 뒷받침하고 있다. 따라서 이러한 허혈성 변화는 간질의 섬유화 현상을 가중시킬 것이며 TGF-β 역시 저염식 군에서 더욱 증가될 것이다.

치은의 비후는 CsA 뿐만 아니라 진경제인 phenytoin 및 항고혈압제인 nifedipine 등에서도 생긴다. 조직학적으로 비후된 양상이 서로 유사하며 혈중 약농도가 높을수록 정도가 심해지는 공통점이 있다[7]. Phenytoin에 의한 치은 비후는 피부성장인자(epidermal growth factor)가 관여할 것으로 생각하고 있고[27], nifedipine은 칼슘을 차단하는 효과가 치은의 구성세포에도 작용하여 세포의 자연사(apoptosis)에 필요한 칼슘을 차단함으로써 세포의 자연소실이 줄어들어서 비후될 것으로 생각하고 있다[27-29].본 실험에서 보인 치은의 TGF-β의 활성도 상승은 치은 비후에 결정적인 역할을 하였으며 저염식은 이들 TGF-β의 활성을

감소시킴으로써 치은 비후의 정도도 줄어들었다고 생각한다.

Transforming growth factor - β(TGF - β)는 원래 그 이름의 의미대로 세포의 형질전환(transformation)을 촉진하는 인자의 하나로서 발견되었다. 25,000의 homodimer로서 혈소판, 뼈, 심장, 간 및 신장 등에 많이 들어 있음이 알려졌고, 상피세포의 성장은 억제시키지만 collagen 합성은 강력히 촉진시키는 인자이므로 각종 섬유화에 중요 역할을 하고 있다[30]. 본 실험에서와 같이 CsA의 투여가 TGF - β를 상승시킴은 다른 연구자들의 결과와 일치하며[1] 치은 비후에 있어서도 TGF - β가 상승될 것임을 예상한 보고들은[31] 있으나 저염식과의 상관관계에 대해서는 많은 문헌의 고찰의 결과 본 논문의 결과가 처음이었다.

Tamaki 등[32] 및 Ying 등[33]이 고염식(8% NaCl)을 준 경우가 저염식(0.3%)을 준 경우보다 TGF - β의 분비가 많음을 증명하여 고혈압 환자가 저염식을 함으로써 동맥경화의 진행을 방지시킬 수 있다는 점을 설명할 수 있게 하였다. 또한 흑인에서 사구체의 섬유화에 의한 신기능부전이 빈발하고 비후성 반흔이 정도도 심한 것은 혈중에 TGF - β가 많기 때문일 것으로 추정하는 보고도 나왔다[34]. 이러한 결과들은 TGF - β의 양의 증감이 각종 섬유화에 영향을 미칠 수 있음을 시사하고 있다.

즉 CsA는 단핵구와 탐식세포에 작용하여 IL - 1 이나 TNF - α 등의 cytokine을 분비하게 함으로서 치은에 존재하는 섬유아 세포를 활성화한다. 이 세포들은 다시 TGF - β, PGE, collagenase 등을 분비함으로써 collagen합성의 증가, 기질의 증가 및 혈관의 확장 등을 초래하여 치은의 비후가 생긴다. 그러나 저염 상태는 이들 섬유아 세포의 활성화를 억제하여 특히 TGF - β의 분비를 억제함으로써 치은 비후의 정도를 감소시킨다고 생각한다. 한편 신장에서는 저염의 상태가 신장에만 유일하게 존재하는 renin - angiotensin계를 자극하여 혈관을 수축하는 작용을 일으킴에 따라 허혈상태를 유발함에 따라 치은과는 달리 TGF - β의 표현이 활발해 진다고 생각한다.

결론적으로 CsA는 TGF - β의 상승효과가 있고 저염식으로 인해 신장에서는 renin - angiotensin의 활성화가 초래되어 더욱 심한 섬유화를 초래하나 치은에서는 저염식으로 인한 전신적 TGF - β 감소 효과로서 오히려 비후가 줄어지는 효과가 나타났다. 따라서 CsA에 의한 치은의 비후는 CsA의 직접적인 효과나 염증에 의한 결과라기보다는 CsA에 의한 TGF - β의 상승이 주원인일 것으로 생각한다.

V. 결론

Cyclosporine(CsA) 장기 투여로 인한 치은 비후의 기전을 알아보고자 Fisher - 344 흰쥐에 CsA를 저염식 및 정상 분말 사료 1g당 300 μg씩 섞어서 6주간 투여한 후 치은 비후 양상을 비교 관찰하였다.

CsA 투여로 인해서 신장 기능은 저염식 군에서 혈중 K^+(4.9mEq/l) 및 크레아틴(0.7±0.1 ㎎/㎖)이 상승하고 사구체 여과율(1.0±0.1㎎/min/g)이 떨어지는 등 정상 식이 군과 비교하여 나빠졌다. 조직 소견에서도 저염식 군에서 간질의 섬유화, 신세뇨관의 위축, 및 소동맥의 초자양 변화 등 전반적인 손상 소견이 뚜렷하였다. 치은에서는 특히 대구치에서 CsA투여로 인한 비후가 관찰되었다. 그러나 그 비후의 정도는 정상 식이에서보다 저염식에서 감소되었다(3.45±0.78mm vs 2.51±0.67mm). 조직학적으로 비후된 치은은 기질이 확장되어 있고 그 속에 섬유모세포와 모세혈관의 증식이 심하였다. 그러나 염증세포의 침윤은 거의 없었다. 이러한 정도는 저염식의 경우 현저히 줄어들었다. 치은의 상피세포는 경한 증식의 소견이 보였다. TGF - β_1을 이용한 면역조직화학적 검사를 시행한 결과 신장에서는 저염식의 경우가, 치은에서는 정상 식이의 경우가 훨씬 양성률이

높았다.

이상의 결과로 CsA에 의한 치은의 증식은 침윤된 염증세포로 인한 이차적인 현상이라는 종래의 주장보다는 CsA가 TGF - β를 상승시키는 효과에 의한 이차적인 결과로 생각된다. 또한 저염식 등의 전신적 TGF - β의 감소를 유도할 수 있는 조건들이 그 정도를 경감시킬 수 있을 것으로 생각한다.

VI. 참고문헌

1. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F, Thiel G. Cyclosporine nephropathy. In: Tisher CC, Brenner BM, editors. Renal pathology with clinical and functional correlations. Philadelphia: JB Lippincott: 1989; p. 1555 - 80.
2. Somacarrera MI, Hernandez G, Acero J, Moskow BS. Factors related to the incidence and severity of cyclosporine - induced gingival over - growth in transplant patients: a longitu - dinal study. J Periodontol 1994; 65: 671 - 5.
3 Earl Fu, Shin Nieh, Chang HL, Wang SL. Dose - dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. J Periodontol 1995; 66: 594 - 8.
4 Chang HL, Fu E, Nieh S, Wang SL. Gingival overgrowth induced by different dosages of cyclosporin in rats. Chung - Hua - I - Hsueh - Tsa - Chih - Taipei 1995; 55: 290 - 5.
5 Deliliers GL, Santoro F, Polli N, Bruno E, Fumagalli L, Risciotti E. Light and elec - tron microscopic study of cyclosporin A - induced gingival hyperplasia. J Periodontol 1986; 57: 771 - 5.
6 O'valle F, Mesa FL, Gomez - Morales M, Aguilar D, Caracuel MD, Medina - Cano MT, et al. Immunohistochemical study of 30 cases of cyclosporin A - induced gin - gival overgrowth. J Periodontol 1994; 65: 724 - 30.
7 Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H. Pathogenesis of drug - induced gingival overgrowth: a review of studies in the rat model. J Periodontol 1996; 67: 463 - 70.
8 Jackson NM, Hsu CH, Visscher GE, Venkatachalam MA, Humes HD. Alterations in renal structure and func - tion in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 1987; 242: 749 - 56.
9 Nast CC, Adler SG, Artishevsky A, Kresser CT, Ahmed K, Anderson PS. Cyclosporine induces elevated procolla - gen alpha 1 (I) mRNA levels in the rat renal cortex. Kidney Int 1991; 39: 631 - 8.
10 Kim YJ, Adler SG, Artishevsky A, Nast CC. Thrombaxane synthetase inhibitor does not prevent the renal scarring of chronic cyclosporine toxicity [abstract]. J Am Soc Nephrol 1993; 4: 755.
11 Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett WM, Couser WG, et al. Cyclosporine A induced arteriolopa - thy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. Kidney Int 1995; 48: 431 - 8.
12 Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E et al. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. Kidney Int 1995; 48: 439 - 48.

13 Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF - beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. Kidney Int 1994; 45: 916 - 27.
14 Pankewycz OG, Miao L, Isaacs R, Guan J, Pruett T, Haussmann G, Sturgill BC. Increased renal tubular expression of transforming growth factor beta in human allografts correlates with cyclosporine toxicity. Kidney Int 1996; 50: 1634 - 40.
15 Adachi C, Kitamura K, Yoshida M, Morisaki I, Sobue S: Cyclosporin - A induced gingival overgrowth - stain dif - ferences in the rats. Jpn J Pediatr Dent 1991; 29 : 24 - 31.
16 Morisaki I, Kitamura K, Kato K, Marukawa Y, Mihara J. Age dependency of cyclosporin A - induced gingival over - growth in rats. Pediatr Dent 1993; 15: 414 - 7, 1993.
17 Morisaki I, Marukawa Y, Mihara J. Relationship between blood cyclosporin A level and gingival overgrowth in rats. J Dent Res 1994; 73: 906.
18 Fu E, Nieh S, Chang HI. Cyclosporine - induced gingival overgrowth in beagle dogs. J Oral Pathol Med 1980; 18: 240 - 5.
19 Kitamura K, Morisaki I, Adachi C, Kato K, Mihara J, Sobue S, et al. Gingival

overgrowth induced by cyclosporin A in rats. Arch Oral Biol 1990; 35: 483 - 486.
20 Seymor RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissue. J Clin Periodontol 1992; 19: 1 - 11.
21 Lafayelle Ra, Mayer G, Meyer TW. The effects of blood pressure reduction on cyclosporine nephrotoxicity in the rat. J Am Soc Nephrol 1993; 3: 1892 - 9.
22 Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF - β1 and matrix proteins in cyclosporine nephropathy. Kidney Int 1997; 52: 660 - 73.
23 Clozel JP, Fischli W, Menard J. Effects of the blockade of the renin - angiotensin system in cyclosporin - induced hypertension. J Hypertens 1993; 11: 75 - 81.
24 Burdmann EA, Andoh TF, Nast C, Lindsley J, Evan A, Connors B, et al. Dissociation between functional an structural changes in chronic cyclosporine(CsA) nephrotoxicity [abstract]. J Am Soc Nephrol 1993; 4: 751.
25 Otsuka F, Yamauchi T, Kataoka H, Mimura Y, Ogura T, Makino H. Effects of chronic inhi - bition of ACE and AT1 receptors on glomerular injury in Dahl salt - sensitive rats. Am J Physiol 1998; 274: R1797 - 806.
26 Burdmann EA, Andoh TF, Nast CC, Evan A, Connors BA, Coffman TM, et al. Prevention of experimental cyclosporin - induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. Am J Physiol 1995; 269: F491 - 9.
27 Mod er T, Andersson G. Regulation of epidermal growth factor receptor metabolism in gingival fibroblasts by phenytoin in vitro. J Oral Pathol Med 1990; 90: 188 - 9.
28 B kenkamp A, Bohnhorst B, Beier C, Albers N, Offner G, Brodehl J. Nifedipine aggravates cyclosporine A - induced gingival hyperplasia. Pediatr Nephrol 1994; 8: 181 - 5.
29 O'Valle F, Mesa F, Aneiros J, G mez - Morales M, Lucena MA, Ramirez C, et al. Gingival overgrowth induced by nifedipine and cyclosporin A: clinical and morphometric study with image analysis. J Clin Periodontol 1995; 22: 591 - 7.
30 김성진. Transforming growth factor -βs. 연구의 역사와 미래. 대한 생화학 · 분자생물학회소식지 1996; 3: 17 - 24.
31 Plemons JM, Dill RE, Rees TD, Dyer BJ, Ng MC, Iacopino AM. PDGF -β producing cells and PDGF -β gene expression in normal gingival and cyclosporine A - induced gingival overgrowth. J Periodontol 1996; 67: 264 - 70.
32 Tamaki K, Okuda S, Nakayama M, Yanagida T, Fujishima M. Transforming growth factor - beta 1 in hypertensive renal injury in Dahl salt - sensitive rats. J Am Soc Nephrol 1996; 7: 2578 - 89.
33 Ying WZ, Sanders PW. Dietary salt enhances glomerular endothelial nitric oxide synthase through TGF - beta 1. Am J Physiol 1998; 275: F18 - 24.
34 Suthanthiran M, Khanna A, Cukran D, Adhikarla R, Sharma VK, Singh T, et al. Transforming growth factor - β1 hyperexpression in African American end - stage renal disease patients: rapid communication, Kidney Int 1988; 53: 639 - 44.

사진부도(Ⅰ)

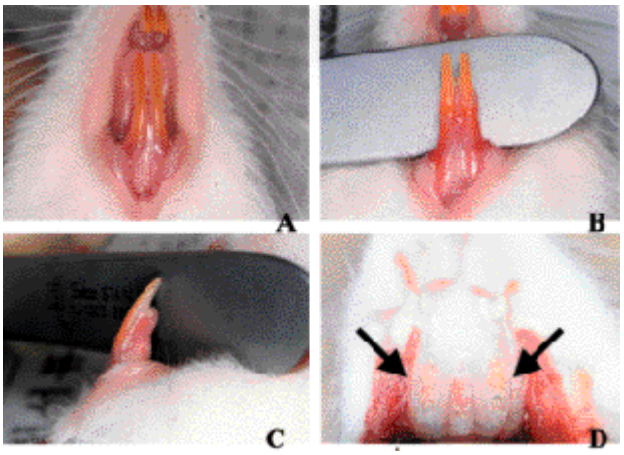

Figure 2

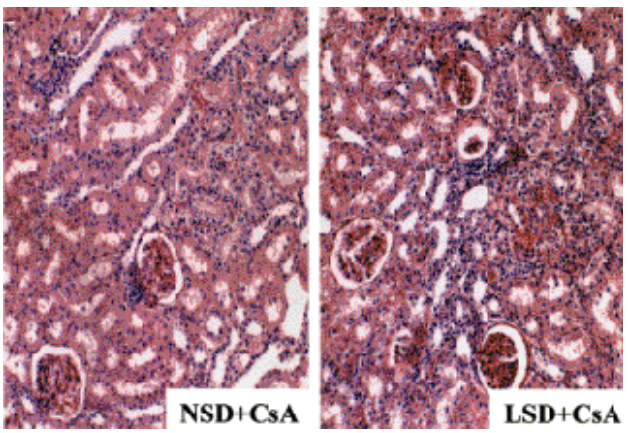

Figure 4

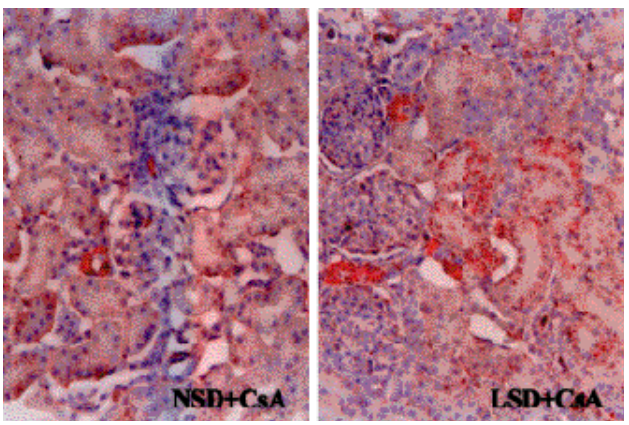

Figure 5

사진부도(Ⅱ)

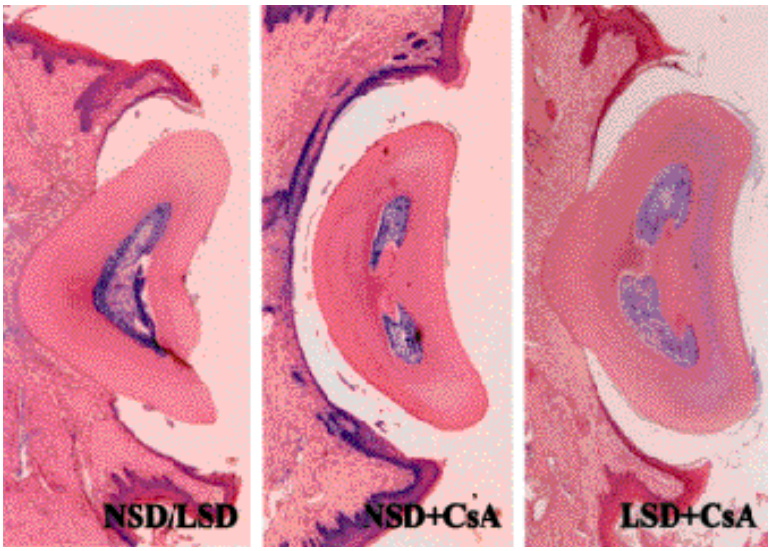

Figure 6

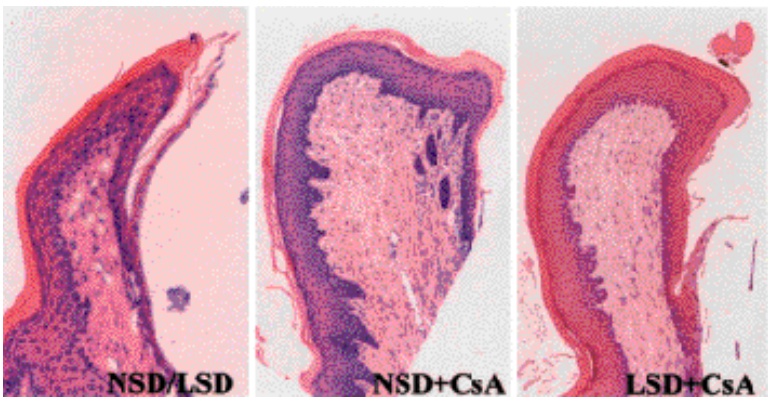

Figure 7

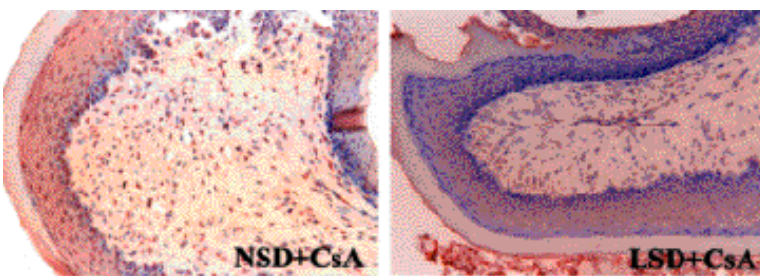

Figure 8

사진부도 설명

Figure 1. Photographs of gingiva of rat. Control group(A) of incisor gingiva; increased vertical height of gingiva(B) and buccolingual length(C) in CsA administration group. Increasement of buccal side(arrows) of gingiva is more prominent than lingual side at molar tooth(D).

Figure 3. Light microscopic changes of CsA administration groups in the kidney are interstitial fibrosis with mononuclar cell infiltration and tubular atrophy. These are more pronounced in low salt diet group (LSD+CsA). PAS x200.

Figure 4. Immunohistochemistry of the kidney for TGF -β_1 shows positive reaction in some tubular epithelial cells and fibroblasts in the interstitium. These are stronger in low salt diet group (LSD+CsA), in which hyalinized arterioles are also positive. x 200.

Figure 5. Gingiva around molar tooth shows hyperplastic change in CsA administra - tion groups compared with normal or low salt diet alone group (NSD/LSD). The degree of hyperplasia in LSD+CsA is less than NSD+CsA. H&E, x40.

Figure 6. High power view of gingiva shows mild covering epithelial hyperplasia and underlying stromal expansion in CsA administration groups, which are less in LSD+CsA. Expanded stroma is composed of proliferated fibroblasts and dilated capillaries. These are also decreased in LSD+CsA group. H&E, x200.

Figure 7. Immunohistochemistry of the gingiva for TGF -β_1 shows positive reaction in fibroblasts in the stroma. These reactions are far weak in LSD+CsA group. x 200.

- Abstract -

Comparative Study of Gingival Changes in Cyclosporine - Induced Nephrotoxicity with Normal and Low Salt Diet

Jae - Gye Lim, Yong - Jin Kim[1], Yong - Hoon Park[2]

Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kyungpook University
Dept. of Pathology[1] and Dept. of Pediatrics[2], Yeungnam University College of Medicine, Taegu, Korea

Cyclosporine A(CsA) is a widely used immunosuppressant for transplant patients and is also used for the treatment of a wide variety of systemic diseases with immunologic disorders. However, its use is frequently limited because of complications such as nephrotoxicity or gingival hyperplasia. Although several hypotheses have been postulated for CsA - induced gingival hyperplasia, i.e. various cytokine effects of inflammatory cells, existence of plaque or CsA itself, but its pathogenesis is still unclear.

For experimental chronic CsA toxicity, salt depletion has been shown to increased susceptibility of rodents to the effects of CsA, and this maneuver facilitates production of arteriolopathy and interstitial fibrosis in kidney that mimic the changes found in human.

The purpose of this study was to evaluate pathogenesis of CsA - induced gingival hyperplasia by comparing changes between CsA administration groups of normal standard diet and those of low salt diet group.

Specific pathogen - free, 20 to 25 days old(120 to 150 g), male Fisher - 344 rats(KIST, Korea), 120 to 150g of body weight, were assigned to four groups of six animals each after one week of adaptation period for powder food. Group 1 received olive oil(300 μl/g of diet) with normal standard diet(0.4% of sodium)(NSD). Group 2 received CsA(Cypol - N, Jonggundang, Korea; 300μg/g of diet) with normal standard diet(NSD+CsA). Group 3 received same amount of olive oil with low salt diet(0.05 % of sodium, Teklad Premier, U.S.A.)(LSD). Group 4 received same dose of CsA with low salt diet(LSD+CsA). Rats were pair fed and were sacrificed after six weeks.

Key word: Gingiva hyperplasia, Cyclosporine, Nephrotoxicity, Low salt diet, TGF -β

Renal histologic lesions associated with CsA, consisted of cortical interstitial fibrosis, tubular atrophy and hyalinization of arterioles and the impairment of renal function including increase of serum creatinine and decrease of glomerular filtration rate was more severe in low salt diet group. These were proved as the results of activated of renin - angiotensin system in the kidney by low salt condition. Meanwhile the degree of gingival hyperplasia at incisor and molar tooth was less severe in low salt diet group compared with normal sodium diet group. Hyperplastic gingiva showed mild epithelial hyperplasia and expanded underlyng stroma which consisted of matrix increasement, capillary proliferation and dilatation. While the number and the activation of fibroblasts were increased, inflammatory cells were rare in the stroma. The immunohistochemistry for TGF - β_1 in the kidney and gingiva revealed stronger positive in LSD+CsA in kidney but in gingiva of NSD+CsA.

These results suggested followings; Gingival hyperplasia can be developed without inflammatory cells infiltration and seemed not induced by CsA by itself. The major role for gingival hyperplasia by CsA would be the secondary effect of TGF - β, which maybe upregulated by CsA administration. Low salt diet can attenuate this hyperplasia perhaps by decreasing the activation of TGF - β.