

Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포주기조절에 미치는 영향

픽성희¹ · 김대겸¹ · 김탁¹ · 유용옥² · 유형근¹ · 신형식¹

¹원광대학교 치과대학 치주과학교실, ²구강생화학교실

1. 서론

Cyclosporin A는 곰팡이의 일종인 *Tolypocladium inflatum*과 *Cylindrocarpum lucidum*에서 분리해낸 lipophilic cyclic polypeptide로 1972년 처음 발견되었으며¹⁾, 면역억제작용이 있어 1978년 Calne 등에 의해 신장이식수술 후 거부반응의 억제를 위해 처음으로 사용되었고²⁾, 현재 장기 이식 환자에서 이식거부의 방지를 위해 단독 혹은 스테로이드와 병행하여 사용하고 있다. 그 외에도 Cyclosporin A는 인슐린 의존성 당뇨, 베세트증후군, 건선 등의 자가 면역 질환을 치료하는데도 널리 사용되고 있다.

Cyclosporin A에 의한 면역억제 작용 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지는 않지만, B 임파구에는 거의 영향을 미치지 않으면서 T 임파구에만 선택적으로 작용하며, T-helper cell과 T-cytotoxic cell의 기능을 억제하는 작용을 발휘하는 약물이라는 연구가 보고되었다³⁾. Cyclosporin A는 면역억제를 위해 임상적으로 널리 사용됨에도 불구하고 많은 부작용이 보고되고 있는데, 가장 흔한 부작용은 간독성, 신독성, 임파종과 다모증의 유발, 그리고 치은조직에 과잉증식을 유발하는 것이다⁴⁾.

Cyclosporin A 투여 환자들에게서 치은증식의 빈

도는 25~81%로 보고되었고, 이러한 차이는 약물의 용량, 혈장 내 농도, 투여 기간, 치은증식에 대한 평가방법 때문인 것으로 알려졌다. Daley 등의 연구에 의하면 치은증식은 정맥내나 경구투여시 500 mg/day 이상이면 일어난다고 보고하였다⁵⁾. 또한 Seymour 등은 치은증식의 정도는 환자의 치주상태보다 혈장내 농도에 더 관련이 있을 것이라고 보고하였다⁶⁾.

Cyclosporin A에 의해 초래된 치은증식은 phenytoin이나 calcium channel blockers인 nifedipin과 같은 약물에 의해 유발되는 치은증식과 유사하며⁷⁾, 일반적으로 치간유두에서 시작하여 전치부 순측에서 치관을 부분적으로 덮는다. 치은증식은 가성치주낭을 형성하고 이로 인해 치주조직의 파괴, 치아의 이동, 치태조절의 어려움, 저작곤란, 심미적 불량 등의 여러 가지 치주적 문제를 야기하게 한다.

치은에서의 이러한 증식은 약물 투여 4~6주 후에 최초로 발생하며, 부착치은대에 한정되어 교합면쪽으로 자라난다. 조직학적 특징은 길어진 다층의 상피와 부전각화된 상피에 의해 둘러싸인 교원질의 과성장을 보이며, 형질세포로 이루어진 만성 염증세포가 존재한다⁸⁾. 또한, 치은섬유아세포도 많이 증가하여 세포내외의 기질 증가와 함께 총부피의 증가를

*이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

교신 저자: 유형근, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 570-711

초래한다⁹⁾.

Cyclosporin A에 의한 치은증식에 있어 치은을 구성하고 있는 섬유아세포의 증식은 중요한 역할을 한다. 치은섬유아세포의 증식은 세포주기 상 G1 주기에 머물러 있던 세포가 S 주기로 전이되어 유사분열이 일어나서 발생하는 것이다¹⁰⁾. 생체 내에서 세포는 세포소멸과 세포분열이 균형을 이루면서 생리적 항상성을 유지하게 되지만, Cyclosporin A의 투여에 의한 치은증식의 경우는 이런 균형이 파괴되게 된다. 세포의 증식은 여러 가지 자극에 의해 결정되며, 자극의 종류와 전달 기전에 따라 세포분열이 일어나거나 멈추게 된다. 또한 특정기능을 보유하도록 분화가 일어나기도 한다. 이런 세포주기의 진행과 억제에는 여러 세포주기 관련 단백질이 관련되어 있다. 이런 단백질로는 세포주기 진행에 중요한 역할을 하는 인산화효소인 cyclin dependent kinase (cdk)와 여기에 결합하여 활성을 조절하는 cyclin, 그리고 이 복합체에 결합하여 그 활성을 저해하는 세포주기억제 단백질을 들 수 있다¹¹⁾. 이들 세포주기조절단백질은 세포활성촉진인자 혹은 세포활성억제인자에 의해 발현이 달라져 세포분열이 촉진되거나, 억제된다. 이런 현상은 생리적으로 세포의 무한증식을 억제하게 되지만, 세포분열촉진인자나 세포의 암성변화에 의해 생리적 균형이 파괴되어 증식이 일어나게 된다.

Cyclosporin A의 투여가 치은섬유아세포와 세포의 기질의 증가를 유발한다는 보고가 되어있지만, 구체적으로 치은섬유아세포의 세포주기의 진행을 촉진시키는지, 촉진시킨다면 어떤 농도에서 촉진을 유발하며, 세포주기 진행을 촉진하는 기전이 무엇인지 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포주기를 조절하는지를 관찰하고, 조절한다면 그 기전은 무엇인지를 밝히고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. Cyclosporin A의 준비

Cyclosporin A (Sigma Co., USA)의 분자식은

$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ (M.W.: 1202.64)로 물에 불용인 성질을 가지고 있다. 외견상으로 백색의 결정 가루성상을 보인다. Ethanol을 용매로 Tween-80을 첨가하여 용해시켜 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml 및 10 ng/ml의 농도로 준비하였다.

2. 치은섬유아세포의 배양

치은섬유아세포는 원광대학교 치과병원을 내원한 환자 중 치관연장술을 요하는 건강한 성인에서 절제하여 얻은 치은조직으로부터 일차 배양하여 얻었다. 절제한 조직은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Co., USA)이 담겨있는 15 ml tube에 담아 혈액이나 이물질을 제거하기 위해 3회 세척한 후, 미생물 오염을 방지하기 위해 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 1% 항생제 (Penicillin G 10,000 units/ml, Amphotericin B 25 μ g/ml, Gibco Co., USA)가 첨가된 DMEM이 들어 있는 100 mm 조직배양접시에 옮겨 No. 15 blade를 사용하여 1 mm²으로 세절하고, 60 mm 배양접시에 5~6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 10% 우태아혈청과 1% 항생제가 포함된 DMEM 3 ml를 첨가하였다. 단일세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단층밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, 0.25% Trypsin/EDTA (1 \times , Gibco Co., USA)를 이용하여 세포배양 접시에 부착된 세포를 분리시킨 후 60 mm 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2~3일 간격으로 교환하였고, 계대배양은 1:3~4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 5~8회 계대배양된 치은섬유아세포를 사용하였다.

3. 세포활성도의 측정

계대배양된 치은섬유아세포를 trypsin-EDTA로 떼어내어 trypan blue로 염색한 후 혈구계수기로 세포

를 세어 24-well plate에 각 well당 1×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 37°C , 5%, CO_2 , 100% 습도의 배양기에서 배양한 후 새로운 DMEM 450 ml를 각각의 well에 첨가하였다. 그리고 Cyclosporin A를 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml의 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양하였으며, 대조군에는 증류수를 넣었다. 48시간이 경과한 후 PBS로 용해한 300 ml의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma Co., USA)를 각각의 well에 넣어 formazan 염으로 환원시키고, 200 ml의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Junsei Co., Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate로 옮겼다. 배양접시를 잘 흔들어 용액을 균질화 시킨 후 ELISA analyser (Spectra, MAX 250, Molecular Devices Co. USA)에 넣고 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포증식율의 측정

Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에 1×10^5 개의 세포가 되도록 분주하였다. 실험군에는 Cyclosporin A를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양한 후 trypan-blue로 염색하고, 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

5. 세포생존율의 측정

Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고, 6-well plate에 1×10^5 개의 세포가 되도록 분주하였다. 실험군에는 Cyclosporin A를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양한 후 trypan blue로 염색하고, 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세

포를 계수하여 아래의 공식을 이용하여 세포생존율을 계산하였다.

$$\text{세포생존율} = \frac{\text{Trypan blue에 염색되지 않은 세포수}}{\text{수확한 전체 세포수}} \times 100$$

6. 세포주기 분석

Cyclosporin A가 첨가된 배양액에서 배양된 세포를 plate로부터 떼어내어 혈구계수기로 세포수를 측정하는 다음 3×10^5 개의 세포를 인산완충용액 (phosphate buffered saline, Gibco Co., USA)으로 세척하고 70% ethanol로 고정시킨 후, RNase A (0.1 mg/ml)를 처리하여 RNA를 제거하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 propidium iodide 용액으로 30분간 염색한 후 flow cytometer (Becton, Dickinson, Mountain View, CA)로 488 nm에서 propidium iodide-DNA complex에서 발생하는 형광을 측정하였다.

7. Western blot 분석

Cyclosporin A가 첨가된 배양액에서 배양된 치은섬유아세포를 PBS로 2회 세척한 후, lysis buffer로 세포 단백질을 추출하고, BCA 용액 (Bicinchoninic acid sol. Sigma Co., USA)에 Copper (II) sulfate (Sigma Co., USA)를 50 : 1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 대조군과 실험군에서 추출된 단백질 50 μg 씩을 사용하여 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 후 PVDF (Immobilon-P membrane, Milipore, USA)에 transfer하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 차단 용액 (Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 다음과 같은 1차 항체들을 이용하여 90분 동안 반응시켰다. 사용된 일차항체는 G1주기 전반부의 활성화를 관찰하기 위한 cdk4 (Santa Cruz Biotechnology, USA), cyclin D₁ (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 사용하였다. 또한, 세포주기의 진행을 억제하는 세포주기조절단백질을 관찰하기 위해 p21 (Santa Cruz Biotechnology, USA),

p53 (Oncogene science, USA)과 p16 (Santa Cruz Biotechnology, USA)도 함께 사용하였다. pRB (Santa Cruz Biotechnology, USA)는 이런 세포주기 조절단백질의 변화가 전사인자의 유리에 영향을 주는가를 평가하기 위해 사용하였다. 1차 항체로 반응시킨 후 차단 완충액으로 2회 세척해 내고, anti-mouse와 anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 차단 완충액으로 세척하였다. 1×assay buffer로 2분 동안 2회에 걸쳐 세척을 해 준 후에 membrane을 Western Star Substrate 용액으로 반응시키고 Hyperfilm-MP (Amersham, UK)에 노출시켰다. 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 1× Ponceau S 용액(Sigma Co., USA)에 염색한 후 발현 정도를 서로 비교하였다.

8. 통계분석

실험결과와의 분석은 SPSS WIN Version 10.0을 사용하여 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법을 이용하여 처리하였다($p < 0.05$).

III. 연구결과

1. 세포활성도

Cyclosporin A를 첨가 배양한 후 MTT 분석으로 세포활성도를 측정된 결과 모든 실험군에서 대조군보다 세포활성도가 증가하였다. 세포활성은 농도에 따라 함께 증가하는 경향을 보였지만, 1 ng/ml 농도 이상에서는 다시 감소하였다. 1 ng/ml 농도가 가장 높은 세포활성도를 보여주었으며, 대조군에 비해 통계학적으로도 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 1).

2. 세포증식율

세포활성도 검사를 바탕으로 치은섬유아세포의 활성을 가장 높게 촉진하는 Cyclosporin A의 *in vitro* 농도를 구하였다. 이 농도(1 ng/ml)로 Cyclosporin A를 배양액에 첨가 2일간 배양하여 살아있는 세포증식율을 측정하였다. 대조군에 비해 Cyclosporin A를 첨가한 실험군에서 45% 증가한 세포증식율을 보였다(Fig. 2).

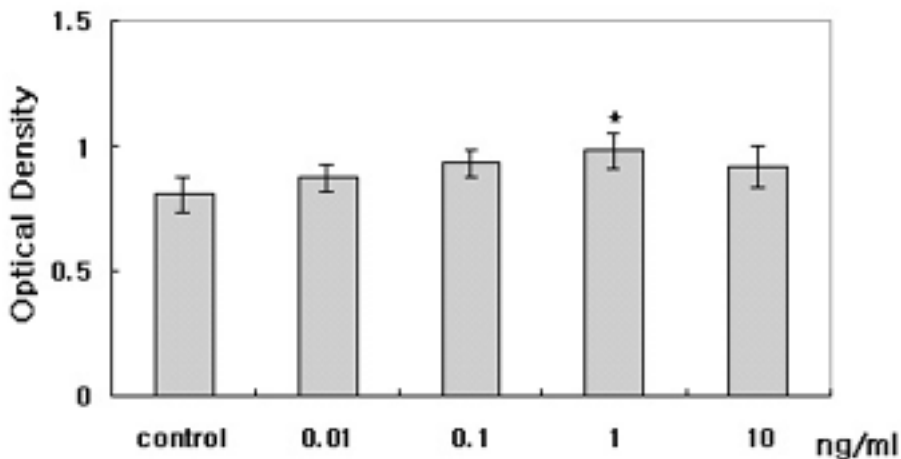


Figure 1. Difference of the optical density according to the concentration of Cyclosporin A. MTT assay was performed after 2 day incubation(mean±S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiment.

*: Significantly different from the control($p < 0.05$)

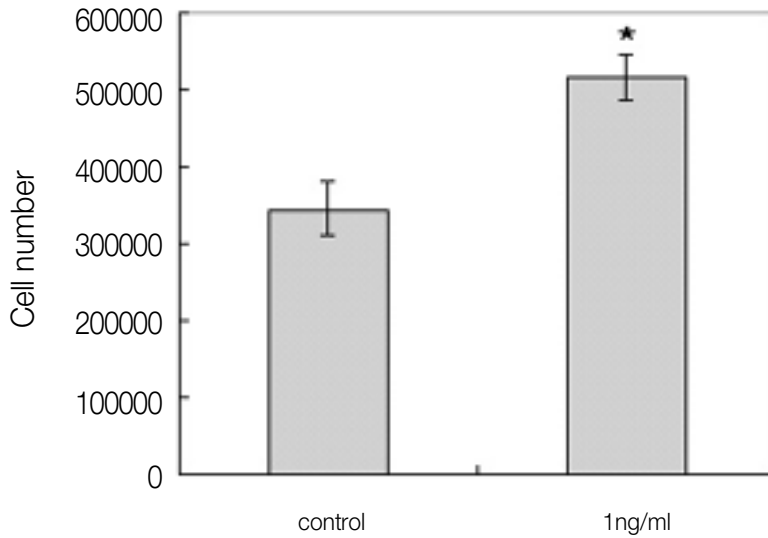


Figure 2. Difference of the cell number between control group and experimental group(1 ng/ml). Cell counting was performed after 2 day incubation (mean±S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

*: Significantly different from the control($p < 0,05$), (n=4)

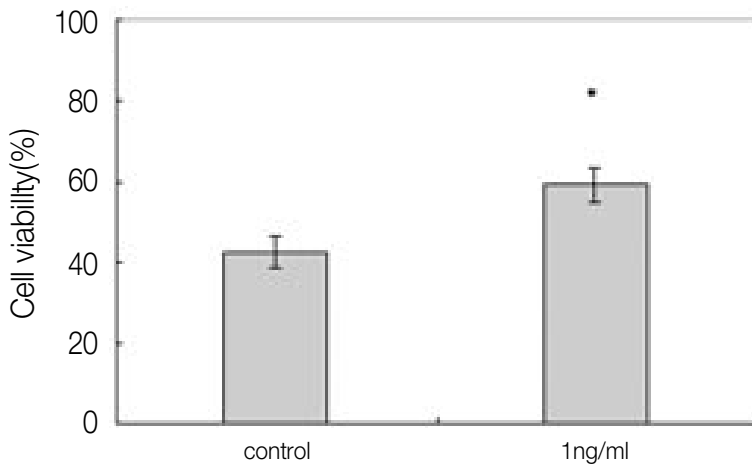


Figure 3. Difference of cell viability between control group and experimental group(1 ng/ml). Cell viability was estimated after 2 day incubation (mean±S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

*: Significantly different from the control($p < 0,05$)

3. 세포생존율

세포활성도 검사를 바탕으로 치은섬유아세포의 활성을 가장 높게 촉진하는 Cyclosporin A의 배양액

농도를 구하였다. 이 배양액 농도(1 ng/ml)로 Cyclosporin A를 배양액에 첨가 2일간 배양하여 세포 생존율을 측정하였다. 대조군에 비해 실험군에서 총세포수에서 살아있는 세포가 차지하는 비율이 높

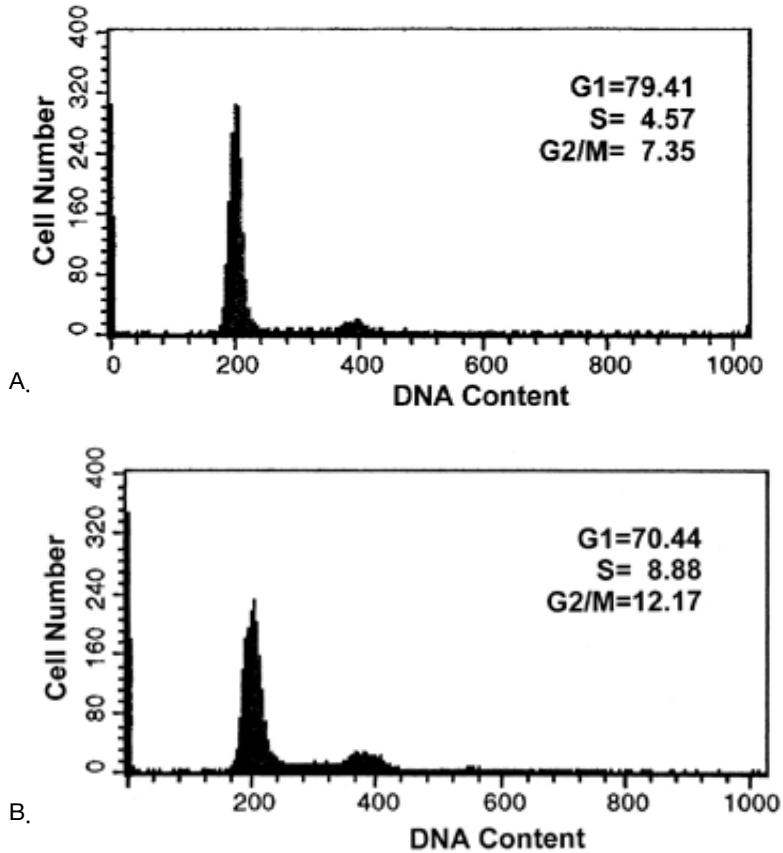


Figure 4. Effect of Cyclosporin A on cell cycle of human gingival fibroblasts. The cell cycle analysis was performed after 2 days incubation(A; control group, B; experimental group(1 ng/ml)).

왔다(Fig. 3). 이런 결과는 Cyclosporin A의 투여가 세포증식을 촉진할 뿐만 아니라 세포의 생존능력까지 향상시킨다는 것을 보여준다.

4. 세포주기 분석

Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포주기변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 1 ng/ml의 Cyclosporin A가 함유된 배양액에 치은섬유아세포를 2일간 배양하여 세포주기를 분석하였다. S 주기는 4.57%에서 8.88%로 증가하였으며, G1 주기는 79.41%에서 70.44%로 감소하였고, G2/M 주기는 7.35%에서 12.17%로 증가하였다. 이러한 결과로 Cyclosporin A의 투여가 치은섬유아세포의 세포주

기 진행을 증가시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

5. cyclin D1과 cdk4의 발현

Cyclosporin A의 치은섬유아세포에 대한 세포주기 조절기전을 연구하기 위하여, 세포주기조절단백질 cyclin D1과 cdk4의 발현을 관찰하였다. 1 ng/ml의 Cyclosporin A를 투여 후, cyclin D1의 발현은 변화가 없었던 반면, cdk4의 발현은 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5).

6. p21과 p53의 발현

Cyclosporin A의 치은섬유아세포에 대한 세포주기

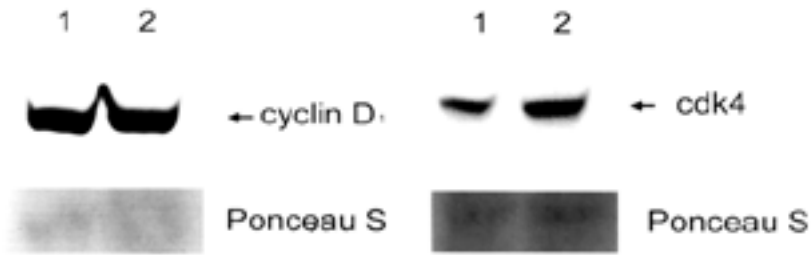


Figure 5. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin D1 and cdk4 in culture human gingival fibroblasts. Lane 1 was control group and lane 2 was experimental group that supplemented with 1 ng/ml Cyclosporin A for 2 days. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin D1 and cdk4 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceus S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

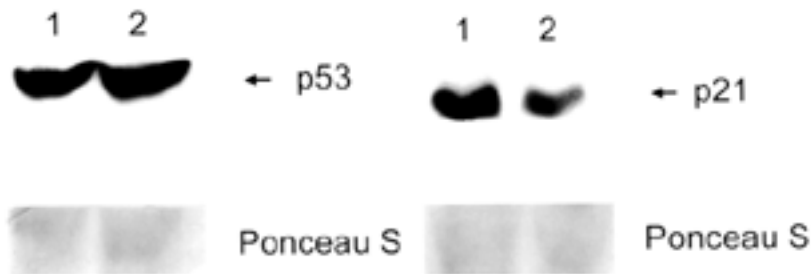


Figure 6. Western blot analysis for intracellular levels of p53 and p21 in culture human gingival fibroblasts. Lane 1 was control group and lane 2 was experimental group that supplemented with 1 ng/ml Cyclosporin A for 2 days. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p53 and p21 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceus S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

조절기전을 연구하기 위하여, 세포주기조절단백질 p21과 p53의 발현을 관찰하였다. 1 ng/ml의 Cyclosporin A를 투여 후, p21의 발현은 감소한 반면, p53의 발현은 변화가 없었다(Fig. 6).

7. pRB와 p16의 발현

Cyclosporin A의 치은섬유아세포에 대한 세포주기 조절기전을 연구하기 위하여, 세포주기조절단백질

pRB와 p16의 발현을 관찰하였다. 1 ng/ml의 Cyclosporin A를 투여 후, pRB의 발현은 감소한 반면, p16의 발현은 변화가 없었다(Fig. 7)

IV. 총괄 및 고찰

일반적으로 치주질환은 치석과 치태 내의 치주병원과 숙주반응에 의해 발생하며, 이런 반응에 의해 연조직의 부종, 울혈, 증식이 일어나고 하부 지지조

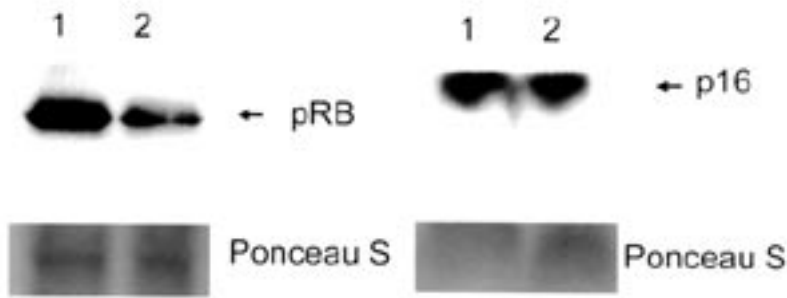


Figure 7. Western blot analysis for intracellular levels of pRB and p16 in culture human gingival fibroblasts. Lane 1 was control group and lane 2 was experimental group that supplemented with 1 ng/ml Cyclosporin A for 2 days. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of pRB and p16 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceus S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

직의 흡수가 발생하여 치아가 상실된다. 그러나, 이런 일반적인 치주질환의 원인 이외에 일부 약품의 전신적 투여가 치은증식을 야기할 수 있으며, 이에 따른 염증성 치주질환이 발생하기도 한다. 치은증식은 증식자체로 인한 심미적 문제 및 치아의 변위, 치태조절의 불량 등의 여러 가지 이차적 문제를 야기한다. 일반적으로 약물유도 치은증식은 섬유성 성분과 염증성 성분으로 구성되어 있다²⁾. 또한, 임상적으로 치료가 필요한 약물유도 치은증식은 약 30% 정도로 환자의 치주적 치료는 2차적인 염증반응을 방지하기 위한 치태조절이 선행되어야 한다. 일부약물은 약물중단이 유일한 방법으로 복용중단 후 몇 달 내에 없어지기도 한다.

치은증식을 발생시키는 약물로는 면역억제제인 Cyclosporin A, 심혈관계질환치료제로 쓰이는 calcium channel blocker인 diltiazem과 nifedipine, 그리고 항진정제로 쓰이는 phenytoin 등이 있다³⁾.

이 연구에 사용된 Cyclosporin A의 실험농도는 투여받고 있는 환자의 혈중 농도뿐 아니라 조직에서의 농도를 반영한 것이다. *In vivo* 연구에서 Cyclosporin A 용량과 혈중농도가 치은증식에 있어 가장 중요한 인자로 알려져 있으며, 혈중농도가 증가할수록 치은증식의 정도도 증가한다⁴⁻⁶⁾. 경구투여

환자에서 상피내 농도는 전혈의 농도보다 10배 높다¹⁷⁾. 또한 De Camargo는 치은조직에서의 Cyclosporin A의 농도가 90 ng/ml에 이른다고 하였다¹⁸⁾. 본 연구에서 사용된 농도는 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 10 ng/ml로 1 ng/ml보다 높은 농도에서는 치은섬유아세포의 증식이 감소하는 경향을 보였다. 이런 결과는 Barber 등¹⁹⁾과 Bartold 등²⁰⁾의 연구결과와 일치한다. Schincaglia 등은 *in vitro*에서 10⁻⁶ g/ml과 10⁻⁷ g/ml사이의 농도는 치은섬유아세포의 증식을 자극하지 못한다고 보고하였다²¹⁾. 이 연구에서도 1 ng/ml를 제외하고는 치은섬유아세포의 유의한 활성을 촉진시키지 못했다. 치은섬유아세포를 이용한 본 연구에서는 Cyclosporin A의 투여로 증식, 활성 그리고 생존율을 촉진하였으나, T 세포를 이용한 다른 연구에서는 증식이 억제되었다. 이 연구에서 T 세포에는 Cyclosporin binding protein인 cyclophilin B란 수용기가 있어, Cyclosporin A와 결합하여 CD3 유도 T 세포증식을 억제한다고 보고하였다²²⁾. 그러나, 치은섬유아세포에 있어 Cyclosporin A와 특이적으로 결합하는 수용기는 아직 규명되지 못하고 있다. 앞으로 Cyclosporin A의 세포막통과에 수용체에 대한 연구도 필요할 것으로 보인다.

선행연구에서는 Cyclosporin A의 투여가 치은섬유

변화는 관찰되지 않았는데 이것은 Cyclosporin A가 p21의 발현에만 선택적으로 작용한다는 것을 보여 준다.

이런 결과로 cdk4와 cyclin D 복합체 활성이 증가에 의한 RB와 E2F결합의 유리를 촉진하며, 전사유전자를 활성화시켜 세포주기를 진행시키고 세포증식을 촉진하며, 또한 *in vivo*에서도 이러한 기전으로 세포증식에 따른 치은증식을 일으키는 것으로 사료된다.

이 연구에서 많은 세포주기조절단백질 중 일부의 발현만을 관찰하여 한계가 있었다. 다른 세포주기조절단백질의 발현과 함께 Cyclosporin A의 치은섬유아세포의 증식 억제농도에 대한 세포주기조절단백질의 변화에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 *in vivo*에서 치은증식을 유발하는 Cyclosporin A를 *in vitro*에서 치은섬유아세포의 배양액에 첨가하였을 때, 세포주기진행이 촉진되며 그 기전은 세포주기진행을 억제하는 p21의 발현을 감소시키고, 세포주기진행에서 중요한 역할을 하는 cdk4의 발현을 증가시킴으로써 이루어지는 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 치은 증식을 야기하는 Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포주기조절에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실시되었다. Cyclosporin A를 치은섬유아세포의 배양액에 첨가하여 세포활성도, 세포증식율, 세포생존율, 세포주기 및 세포주기조절단백질 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치은섬유아세포의 배양에서 Cyclosporin A의 첨가농도가 증가할수록 세포의 활성도가 증가하였으며, 특히 1 ng/ml에서 유의성 있는 증가를 보였다($p < 0.05$).
2. 치은섬유아세포에 Cyclosporin A를 1 ng/ml의 농도로 첨가하고 세포증식율을 평가한 결과 대조군에 비해 증가하였다($p < 0.05$).
3. 치은섬유아세포에 Cyclosporin A를 1 ng/ml의

농도로 첨가하고 세포생존율을 평가한 결과 대조군에 비해 증가되었다($p < 0.05$).

4. 치은섬유아세포에 Cyclosporin A를 1 ng/ml의 농도로 첨가하고 세포주기를 평가한 결과 대조군에 비해 S 주기는 증가하고, G1 주기는 감소하는 경향을 보였다.
5. 치은섬유아세포에 Cyclosporin A를 1 ng/ml의 농도로 첨가한 경우 cdk4의 발현은 증가하고 p21과 pRB는 감소하였으며, cyclin D1, p53과 p16의 발현은 큰 변화가 없었다.

이러한 실험결과는 Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포주기 진행을 촉진시키며, 그 기전은 cdk4의 발현증가와 p21과 pRB의 발현감소를 유발함으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Keown P.A., Stiller C.R. : Ciclosporina: una lama a doppio taglio. *Minuti* 77: 25-39, 1973.
2. Calne R.Y., White D.J., Thiru S., Evans D.B., McMaster P., Dunn D.C., Craddock G.N., Pentlow B.D., Rolles K. : Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 23-30: 1323-1327, 1978
3. Clerici M., Shearer G.M. : Differential sensitivity of human T helper cell pathways by *in vitro* exposure to Cyclosporin A. *J Immunol* 144: 2480-2485, 1990.
4. Montebugnoli L., Bernardi F., Magelli C. : Cyclosporin-A-induced gingival overgrowth in heart transplant patients. A cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 23: 868-872, 1996.
5. Daley T.D., Wysocki G.P., Day C. : Clinical and pharmacologic correlations in Cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 62: 417-421, 1986.
6. Seymour R.A., Smith D.G., Rogers S.R. : The comparative effects of azathioprine and

- Cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. A longitudinal study. *J Clin Periodontol* 14: 610-613, 1987.
7. Butler R.T., Kalkwarf K.L., Kaldahl W.B. : Drug-induced gingival hyperplasia: phenytoin, Cyclosporine, and nifedipine. *J Am Dent Assoc* 114: 56-60, 1987.
 8. Rateitschak-Pluss E.M., Hefti A., Lortscher R., Thiel G. : Initial observation that Cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 10 :237-246, 1983.
 9. Mariani G., Calastrini C., Carinci F., Bergamini L., Calastrini F., Stabellini G. : Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in Cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 67 :21-72, 1996.
 10. Nurse P. : Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547-550, 1994.
 11. Kato J.A., Matsuoka M., Strom D., Sherr C. : Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 14: 2713-2721, 1994.
 12. Bartold P.M. : Cyclosporine and gingival overgrowth. *J Oral Pathol* 16: 464-468, 1987.
 13. Brown R.S., Beaver W.T., Bottomley W.K. : On the mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol Med* 20: 201-209, 1991.
 14. Margiotta V., Pizzo I., Pizzo G., Barbaro A. : Cyclosporin-and nifedipene-induced gingival overgrowth in renal transplant recipients correlates with periodontal and pharmacological parameters and HLA-antigens. *J Oral Pathol Med* 25: 128-134, 1996.
 15. Thomason J.M., Seymour R.A., Rice N. : The prevalence and severity of Cyclosporine and nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 20: 37-40, 1993.
 16. Morisaki I., Akiyama Y.M., Miyawaki Y.N., Mori Y. : Positive correlation between blood Cyclosporin A level and severity of gingival overgrowth in rats. *J Periodontol* 68: 7-11, 1997.
 17. Fisher G.J., Duell E.A., Nickoloff B.J. : Levels of Cyclosporin in epidermis of treated psoriasis patients differentially inhibit growth of keratinocytes cultured in serum free versus serum containing media. *J Invest Dermatol* 91: 142-146, 1988.
 18. De Camargo P. : Levels of Cyclosporin A in human gingival tissue. Los Angeles, California: University of California, Los Angeles, 1991.
 19. Barber M.T., Savage N.W., Seymour G.J. : The effect of Cyclosporin and LPS on fibroblasts: Implications for Cyclosporin induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 63 :397-404, 1992.
 20. Bartold P.M. : Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic activity by Cyclosporin A *in vitro*. *J Periodont Res* 24: 314-321, 1989.
 21. Schincaglia G.P., Forniti F., Cavallini R., Piva R., Calura G., del Senno L. : Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Oral Pathol Med* 21: 181-185, 1992.
 22. Denys A., Allain F., Masy E., Dessaint J.P., Spik G. : Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of Cyclosporine. *Transplantation* 65: 1076-1084, 1998.
 23. Kataoka M., Shimizu Y., Kunikiyo K., Asahara Y., Yamashita K., Ninomiya M., Morisaki I., Ohsaki Y., Kido J.I., Nagata T. : Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell Physiol* 182: 351-358, 2000.
 24. Newell J., Irwin C.R. : Comparative effects of Cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 68: 443-447, 1997.

25. Waga S., Hannon G.J., Beach D., Stillman B. : The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369: 574-578, 1994.
26. Gartel A.L., Serfas M.S., Tyner A.L. : p21-negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 213: 138-149, 1996.
27. Zhang H., Xiong Y., Beach D. : Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Cell Biol* 13: 897-906, 1993.
28. Kim T. K. : *in vitro* Transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 300-302, 1997.
29. Xiao H., Hasegawa T., Miyaiishi O., Ohkusu K., Isobe K. : Sodium Butyrate Induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-Independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 457-460, 1997.
30. Haapajarvi T., Kivinen L., Heiskanen A., des Bordes C., Datto M.B., Wang X.F., Laiho M. : UV Radiation is a transcriptional inducer of p21Cip1/ Waf1Cyclin-Kinase inhibitor in a p53-Independent manner. *Exp Cell Res* 248: 272-279, 1999.
31. Kaye P.V., Radebold K., Isaacs S., Dent D.M. : Expression of p53 and p21waf1/cip1 in gastric carcinoma: lack of inter-relationship or correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* 26: 39-43, 2000.
32. Patel S.D., Tran A.C., Ge Y., Moskalenko M., Tsui L., Banik G., Tom W., Scott M., Chen L., Van Roey M., Rivkin M., Mendez M., Gyuris J., McArthur J.G. : The p53-independent tumoricidal activity of an adenoviral vector encoding a p27-p16 fusion tumor suppressor gene. *Mol Ther* 2: 161-169, 2000.

Effects of Cyclosporin A on the Cell Cycle Regulation of Human Gingival Fibroblasts

Sung-Hee Pi¹, Dae-kyum Kim¹, Tak Kim¹, Yong-Ouk You², Hyung-Keun You¹, Hyung-Shik Shin¹

¹ Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

² Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University

Cyclosporin A is a cyclic polypeptide produced by the metabolism of fungi. It is widely used at present as immunosuppressive treatment following organ transplants. It is also used to deal with autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or type II diabetes. Gingival hyperplasia is one of the most frequent side-effects associated with the prescription of Cyclosporin A. The mechanisms involved in Cyclosporin A induced gingival hyperplasia are not yet clear. *In vitro* Cyclosporin A promotes proliferation of gingival fibroblasts, that Cyclosporin A act as a mitogen. Its action is based on mitosis of gingival fibroblasts regulated by cell cycle regulatory proteins.

It was the purpose of the present study to examine the effects of Cyclosporin A on human gingival fibroblasts by means of biological and biochemical criteria. In this present study, we examined change of cell proliferation, cell activity, cell viability and cell cycle progression after application of Cyclosporin A. We also examined expression of cell cycle regulatory proteins by western blot analysis.

Human gingival fibroblasts were cultured for 48 hours with application of Cyclosporin A at concentrations of 0.01, 0.1, 1, and 10 ng/ml. Cyclosporin A(1 ng/ml) significantly increased the cell activity of gingival fibroblast. Proliferation and viability of gingival fibroblasts were also increased in group treated with 1 ng/ml of Cyclosporin A compared to control group. In the cell cycle analysis, S phase was increased and G1 phase was decreased in the group treated with 1 ng/ml of Cyclosporin A. Cyclosporin A increased the expression of cdk4 and inhibited the expression of pRB and p21.

These results suggest that 1 ng/ml of Cyclosporin A may increase the cell cycle progression of human gingival fibroblasts, and its mechanisms may increase the expression of cdk4 and decrease the expression of pRB and p21.