

## Cyclosporine A에 의해 과증식된 치은 조직에서 배양된 섬유아세포의 성장인자 발현에 관한 연구

김영면<sup>1</sup> · 황경균<sup>1,2</sup> · 이재선<sup>1,2</sup> · 박창주<sup>1,2</sup> · 심광섭<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, <sup>2</sup>한양대학교 의생명과학연구원

### Abstract

#### THE mRNA EXPRESSION OF GROWTH FACTORS IN FIBROBLAST FROM GINGIVAL HYPERPLASIA INDUCED BY CYCLOSPORINE A

Young-Muen Kim<sup>1</sup>, Kyung-Gyun Hwang<sup>1,2</sup>, Jae-Seon Lee<sup>1,2</sup>,  
Chang-Joo Park<sup>1,2</sup>, Kwang-Sup Shim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hanyang University

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Science (IBS), Hanyang University

Cyclosporine A (CsA) is a powerful immunosuppressive agent used to prevent graft rejection of organ and treat autoimmune disease. One of the major side effects associated with CsA treatment is the development of gingival overgrowth. The purpose of this study was to investigate the mRNA expression and association of the several growth factors in gingival overgrowth induced by CsA, respectively. Gingival fibroblasts were obtained from gingival tissues of healthy donor and the patients treated with CsA. The cultured gingival fibroblasts were incubated with increasing concentrations of CsA for 24 hours, and the expression of MMP-1, TIMP-1, TGF- $\beta_1$ , p21 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of MMP-1 was slightly increased according to the concentration of treated CsA, but there was no statistical significance. TIMP-1 showed the increased expression at the CsA concentration of 250 and 500 ng/ml and significantly decreased at the CsA concentration of 750ng/ml. TGF- $\beta_1$  showed the increased expression at the CsA concentration of 500 and 750 ng/ml. The expression of p21 was not changed significantly. We concluded that the gingival hyperplasia induced by CsA was more related with TGF- $\beta_1$  than MMP-1 or TIMP-1 on gingival collagen metabolism in patients treated with CsA.

**Key words:** MMP-1, TIMP-1, TGF- $\beta_1$ , p21, Cyclosporine A

### I. 서 론

Cyclosporine (CsA)은 장기이식환자에 있어서 이식거부 반응을 막기 위해서 사용되는 주된 면역억제제이며, 최근 건선(psoriasis), 베체트 병(Behcet's disease), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 등의 자가면역질환의 치료에도 사용되고 있다<sup>1-2)</sup>. 장기이식의 성공률이 높아짐에 따라 CsA을 장기간 투여하게 되는 데, 이에 따른 신독성, 간독성, 고혈압, 신경독성, 신장과 폐의 섬유화 등의 전신적인 합병증과 비정상적인 치은증식이 CsA의 주된 합병증으로

보고되고 있다<sup>1,3-7)</sup>.

CsA과 관련된 치은증식은 1980년에 Starzl 등<sup>8)</sup>에 의해 서 이식수술을 받은 환자에서 처음으로 관찰되었고, Ryffel 등<sup>9)</sup>은 개와 고양이에 CsA를 투여하여 치은의 과증식을 유발된다는 것을 동물실험에서 확인하였다. 신장 이식환자에 사용된 면역억제제에 의한 치은증식은 1983년 Rateitschak-pluss 등<sup>10)</sup>에 의해 처음 치과관련 논문에서 보고된 후 많은 연구자들에 의해 논의되어 왔다. Friskopp 등<sup>11)</sup>은 CsA에 의한 치은의 과증식은 부착치은에서 발생하며, 무치악의 경우는 과증식이 일어나지 않는다고 보고하였

고, Tyldesley 등<sup>12)</sup>은 CsA 투여와 관련된 치은증식은 모든 환자에게서 나타나는 것이 아니라, 25-81%의 범위에서 선택적으로 관찰된다고 하였다.

CsA에 의한 치은증식의 확실한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, 많은 연구들에서 섬유성 증식과 염증반응이라는 두 가지 요소가 치은증식에 관여된다고 보고하고 있으며, 염증 반응에 원인을 두는 기전으로는 T형 임파구의 작용을 억제하는 기전에서 cytokine들의 활성화에 영향을 주는 과정에 CsA가 작용한다고 보고되었다<sup>6,13)</sup>. 최근에는 섬유아세포에 의한 콜라겐과 단백질의 형성증가와 콜라겐분해효소의 활성화 감소가 주된 원인이며, 여기에는 여러 cytokine이 영향을 미친다는 연구들이 진행되고 있는데, 이런 섬유화에 관련된 인자들로는 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1), TIMP-1 (tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinase), TGF- $\beta_1$  (transforming growth factors), type I procollagen 등이 연구되고 있다<sup>14-20)</sup>.

MMP는 아연을 포함하고 있는 세포외기질 단백분해효소로서 20여종이 있으며, 세포외기질 중 세포간질이나 기저막 콜라겐, 단백질, fibronectin, laminin과 같은 단백질로 구성된 물질을 분해시켜, 태아의 발육, 성장, 창상의 치유와 같은 결합조직 재형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 금속단백효소의 활성화는 세포외적으로 조절할 수 있으며 자연적인 억제인자인 특이성 금속단백 효소 억제인자와의 상호작용에 의해서 조절될 수 있다<sup>21)</sup>.

p21은 가장 강력한 세포주기조절 인자로 두 가지의 독립적인 방법으로 세포 증식을 억제한다<sup>22)</sup>. 정상세포에서 p21 단백질은 cyclin/CDK (cyclin dependant kinase) 복합체와 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 사중결합을 이루고 있으면, CDK와 결합하여 CDK의 작용을 방해함으로써 세포주기가 G1에서 S 단계로 넘어가는 것을 조절하거나, PCNA와 결합하여 DNA 복제효소를 통해서 DNA 합성이나 핵산의 excision repair에 작용한다<sup>23)</sup>. MMP-1과 마찬가지로 p21도 CsA에 의해서 발현이 증가된다는 보고가 있고, CsA으로 인한 치은증식이 세포주기 인자의 조절에 관여할 가능성에 대한 논문들이 최근에 발표되고 있다<sup>24)</sup>. 이러한 CsA에 의한 치은 증식 기전의 이해는 구강악안면 영역의 장기 이식에 유용할 뿐만 아니라, 구강점막의 조직공학 연구에도 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

CsA에 의한 치은증식에서 콜라겐의 생성에 관련된 성장인자와 관련된 연구들이 많이 진행되고 있으나, 세포분열의 주기를 조절하는 성장인자들과 콜라겐 생성에 관련된 성장인자들의 상관관계를 규명하는 연구는 아직은 많이 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구는 CsA에 의한 치은 증식에서 CsA의 투여 농도에 따른 섬유아세포의 MMP-1, TIMP-1, p21, TGF- $\beta_1$ 에서 발현정도를 관찰하여, 면역억제제 CsA에 의한 비정상적인 치은증식에 관련된 성장인자들의 조절

기전을 알아보려고 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구를 위해 한양대학교병원에서 신장이식수술을 받고, 신장내과에 내원하여 CsA을 복용하고 있는 환자 중에서 비정상적인 치은증식을 보인 환자 3명에서 치은 절제술을 시행하여 얻은 치은 조직을 실험 군으로 하였다. 면역억제제를 복용하고 있지 않은 건강한 성인 3명에서 제 3 대구치 발치 시 얻은 정상 치은 조직을 대조군을 사용하였다. 치은 조직의 채취 시에 환자의 동의를 받았고, 이와 관련된 실험에 대한 내용은 한양대학교 병원 기관윤리심의위원회에서 허가를 받았다.

### 2. 연구방법

#### 1) 세포 배양

실험에 사용된 정상 및 치은 증식 환자의 치은 조직으로부터 섬유아세포를 얻었다. 치은 조직을 PBS (phosphate-buffered saline: Gibco, NY)에 여러 번 세척 한 다음 4°C의 dispase II 용액 (Roche, Germany)에 18 - 20 시간 담가두었다. 각화 상피층을 분리한 다음 결합조직을 잘게 잘랐다. 잘게 자른 후에 생긴 덩어리 부유물을 falcon tube에 모은 후 원심 분리하여 모았다. 얻어진 세포덩어리를 10% FBS Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 배양 후 4일 부터 치은 섬유아세포가 자라나오기 시작하였다. 각 계대별로 세포의 수와 활성을 평가하기 위해서 trypan blue 염색을 시행하였다. 실험에서는 fetal borine serum을 포함한 두번째 또는 세번째 계대의 세포를 사용하였다.

#### 2) Cyclosporine A 처리

치은 섬유아세포 ( $1 \times 10^4$  cells/well)에 CsA 농도 (ng/ml) 0, 250, 500, 750, 1000으로 24시간 동안 처리하였다.

#### 3) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA를 추출하기 위해서 먼저, CsA 각 농도로 처리된 세포배양 well의 상등액을 걷어내고, Easy Blue™ (Intron, Seong Nam, Korea)를 1 ml/well 씩 tube에 넣고 재부유시킨 다음, chloroform 200  $\mu$ 를 더하여 세계 흔들고 난 뒤 13000 rpm, 15분간 4°C에서 원심분리 하였다. 상층에서 400  $\mu$ 를 취하여 새 튜브에 옮겨 넣고 여기에 iso-

propanol을 동량 넣어 RNA를 침전시켰다. 실온에서 10분간 방치한 다음 13000 rpm, 5분간 4℃에서 원심분리한 뒤 상등액을 걷어내고, 마지막으로 75% 에탄올을 넣어 10000 rpm, 5분간 4℃에서 원심분리하여 상등액을 버리고 RNA를 얻었다. 추출된 RNA를 cDNA로 변환시키기 위해서 RNA를 70℃의 0.5 μg random nonamer (Genotech, Korea)에서 5분 동안 반응시킨 후 4℃에서 냉각시켰다. 다음 RNA-nonamer를 10 mM dNTP mix (Intron) 2 μl, reverse transcriptase M-MuLV (MBI Fermentas, MD) 1 unit, 5X M-MuLV dilution buffer (MBI) 4 μl, and RNase inhibitor (MBI) 0.5 μl과 섞어 20 μl에 되도록 nuclease-free water (Promega, WI)를 사용하여 조절하였다. 이 혼합물을 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 72℃에서 10분, 4℃에서 5분으로 incuba-

tion하였다. PCR은 2 μl의 cDNA에 2.5 mM dNTP mix (Intron) 2 μl, 10 X Taq buffer (Intron) 2 μl, Taq polymerase (Intron) 0.2 μl, 10 pmol 각 유전자에 맞는 forward 및 reverse primers (Genotech)를 사용하여 시행하였다. β-actin, MMP-1, TIMP-1, p21과 TGF-β<sub>1</sub>의 cDNA는 각각의 specific primer쌍을 사용하였다. 정확한 mRNA 양을 측정하기 위해서 β-actin의 발현을 관찰하였다. 사용된 각각의 primer들은 Table 1과 같다. PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 10 μl씩 취하여 6x loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 3.0% glycerol in water) 1 μl와 혼합하여 agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 Gel-Doc (Bio-rad, CA)에서 분석하였다. 각각의 샘플에서 나온 target mRNA transcripts의 band intensity

**Table 1.** The sequences of used primers and the condition of PCR

Primers	Sequence (5' → 3')	Condition		Cycle	Size
MMP-1-FW	GGT GAT GAA GCA GCC CAG	95℃	3 min	30	438bp
		95℃	30 sec		
		58℃	30 sec		
		72℃	30 sec		
MMP-1-RV	CAG TAG AAT GGG AGA GTC	72℃	2 min	∞	
		4℃	∞		
		94℃	3 min		
		93℃	45 sec		
TIMP-1-FW	TGC ACC TGT GTC CCA CCC CAC CCA CAG ACG	58℃	45 sec	40	551bp
		72℃	90 sec		
		72℃	7 min		
		4℃	∞		
TIMP-1-RV	GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG CCA GGT	94℃	3 min	34	246bp
		94℃	30 sec		
		55℃	60 sec		
		72℃	30 sec		
TGF-β <sub>1</sub> FW	AAG TGG ATC CAC GAG CCC AA	72℃	7 min	∞	
		4℃	∞		
		94℃	5 min		
		94℃	45 sec		
TGF-β <sub>1</sub> RV	GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC	60℃	45 sec	33	506bp
		72℃	45 sec		
		72℃	7 min		
		4℃	∞		
p21-FW	AGG ATC CAT GTC AGA ACC GGC TGG	94℃	3 min	28	524bp
p21-RV	CAG GAT CCT GTG GGC GGA TTA GGG	94℃	30 sec		
		55℃	60 sec		
		72℃	60 sec		
		72℃	7 min		
β-actin-FW	TCA GAA GGA CTC CTA TGT GG	72℃	7 min	∞	
		4℃	∞		
		94℃	3 min		
		94℃	30 sec		
β-actin-RV	TCT CTT TGA TGT CAC GCA CG	55℃	60 sec	28	524bp
		72℃	60 sec		
		72℃	7 min		
		4℃	∞		

PCR: Polymerase Chain Reaction, MMP; Matrix metalloproteinase, TIMP; Tissue specific inhibitor of matrix metalloproteinase, TGF; Transforming growth factor.

는  $\beta$ -actin band에 대한 상대적인 비율로 계산하였다.

4) 통계처리

결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, 농도에 따른 각각의 유전자 발현에 대한 차이는 Wilcoxon sign 검증에서 95% 신뢰 구간에서 유의성 검증을 시행하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1) CsA 농도에 따른 MMP-1의 발현양상

MMP-1과  $\beta$ -actin mRNA 발현 양상은 438bp, 524bp에서 각각 관찰되었다. MMP-1 mRNA 발현양상은  $\beta$ -actin mRNA의 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 정상인의 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도에 따른 MMP-1의 발현에 차이가 관찰되지 않았다. 반면, 치은 증식환자에서 배양한 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도가 증가함에 따라서 MMP-1의 발현도 약간씩 증가하는 것으로 관찰되었지만, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 1).

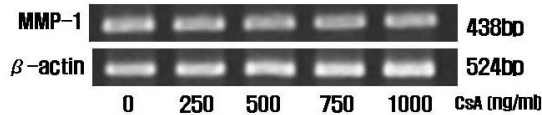
2) CsA 농도에 따른 TIMP-1의 발현양상

TIMP-1과  $\beta$ -actin mRNA 발현 양상은 551bp, 524bp

에서 각각 관찰되었다. TIMP-1 mRNA 발현양상은  $\beta$ -actin mRNA의 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 정상인의 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도에 따른 TIMP-1의 발현에 차이가 관찰되지 않았다. 치은 증식환자에서 배양한 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도가 증가함에 따라서 TIMP-1의 발현은 250, 500ng/ml에서 일시 증가하였으나, 농도 증가에 따른 발현변화는 나타나지 않았고, 통계적으로 유의하지 못했다. 다만, 750ng/ml에서 유의한 감소가 관찰되었다(Fig. 2).

3) CsA 농도에 따른 TGF- $\beta$ 1의 발현양상

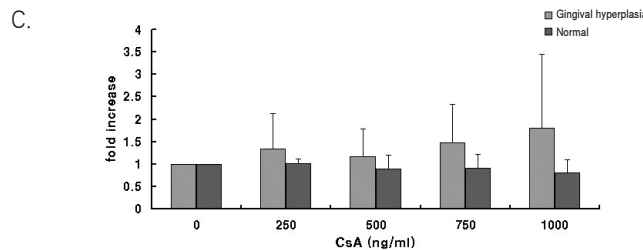
TGF- $\beta$ 1과  $\beta$ -actin mRNA 발현 양상은 246bp, 524bp에서 각각 관찰되었다. TGF- $\beta$ 1 mRNA 발현양상은  $\beta$ -actin mRNA의 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 정상인의 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도에 따라 TGF- $\beta$ 1의 발현이 CsA 농도 750 ng/ml까지 증가하다가 1000 ng/ml의 농도에서 감소되는 경향을 보였다. 치은 증식환자에서 배양한 치은 섬유아세포에서도 CsA의 농도가 증가함에 따라서 TGF- $\beta$ 1 발현도 정상과 비슷한 양상이 관찰되었고, 특히 500, 750 ng/ml에서는 유의한 증가를 보였다(Fig. 3).



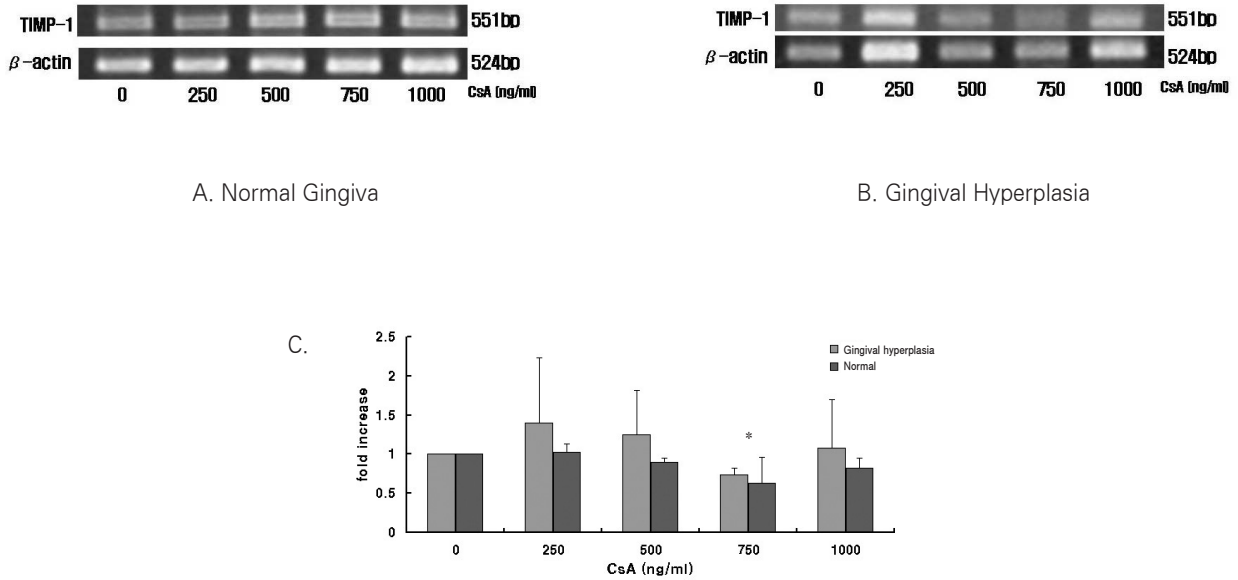
A. Normal Gingiva



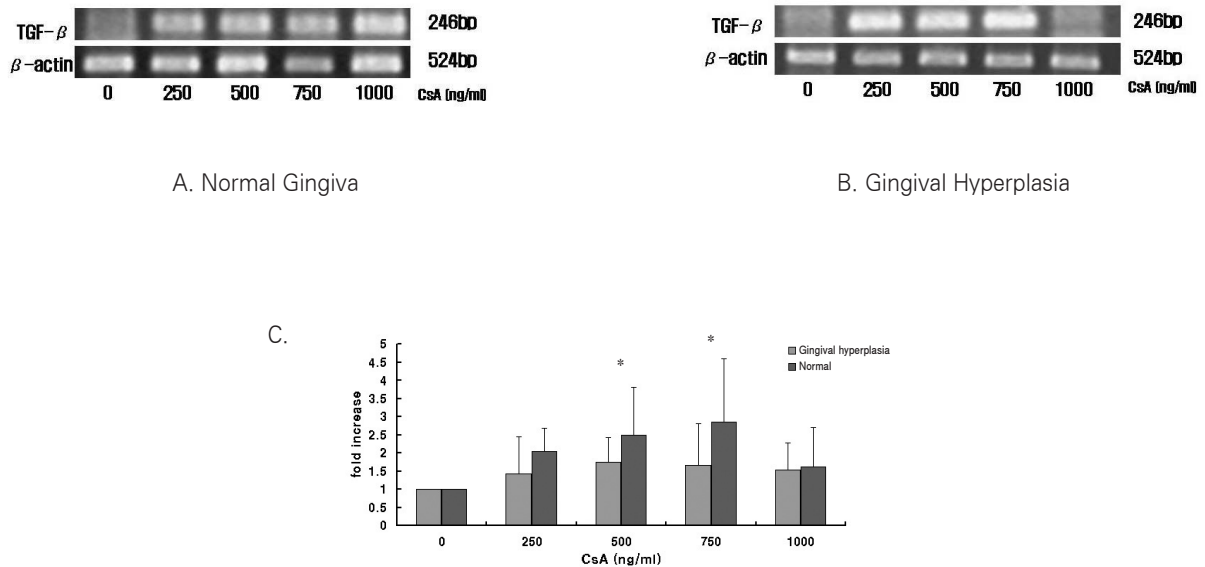
B. Gingival Hyperplasia



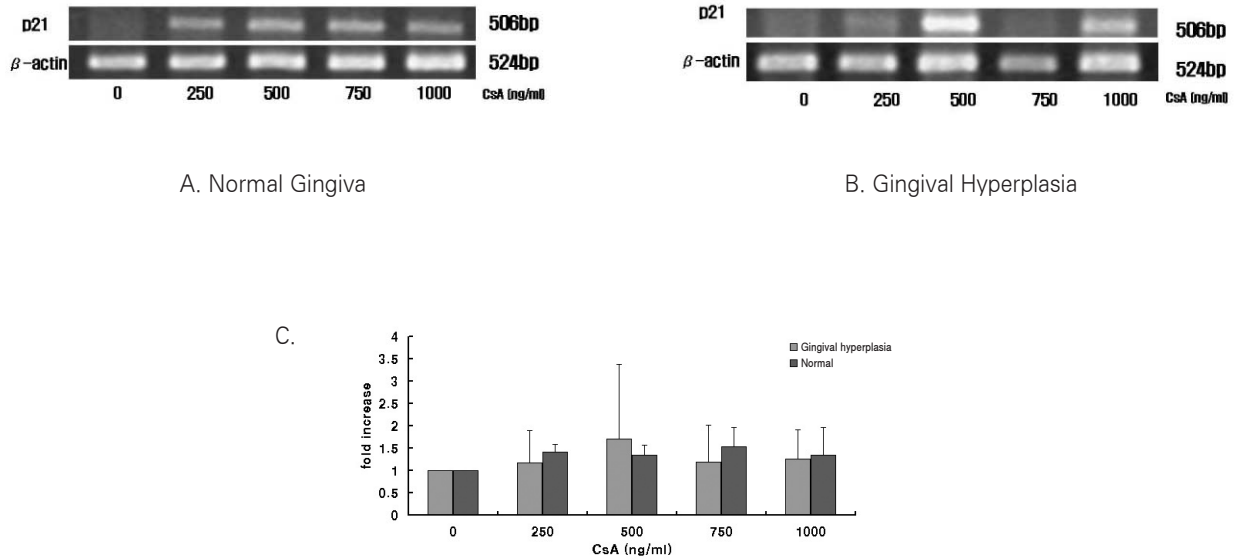
**Fig. 1.** Effect of CsA on production of MMP-1 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to MMP-1 and  $\beta$ -actin, the products were resolved in a agarose gel and ethidium bromide stain (A: Normal gingival fibroblast, B: Hyperplastic gingival fibroblasts). C. Comparison of MMP-1 mRNA expression in gingival fibroblasts treated with CsA. The expression of MMP-1 according to CsA concentration was not statistically significant.



**Fig. 2.** Effect of CsA on production of TIMP-1 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to TIMP-1 and  $\beta$ -actin, the products were resolved in a agarose gel and ethidium bromide stain (A: Normal gingival fibroblasts, B: Hperplastic gingival fibroblasts). C. Comparison of TIMP-1 mRNA expression in gingival fibroblasts treated with CsA. The expression of TIMP-1 was increased at CsA concentration of 250 and 500 ng/ml and significantly decreased at CsA concentration of 750 ng/ml (\* $p$ <0.05).



**Fig. 3.** Effect of CsA on production of TGF- $\beta$ 1 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ -actin, the products were resolved in a agarose gel and ethidium bromide stain (A: Normal gingival fibroblasts, B: Hyperplastic gingival fibroblasts). C. Comparison of TGF- $\beta$  mRNA expression in gingival fibroblasts treated with CsA. The expression of TGF- $\beta$ 1 was increased at CsA concentration of 500 and 750 ng/ml(\* $p$ <0.05).



**Fig. 4.** Effect of CsA on production of p21 by human gingival fibroblasts. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to MMP-1 and  $\beta$ -actin, the products were resolved in a agarose gel and ethidium bromide stain (A: Normal gingival fibroblast, B: Hyperplastic gingival fibroblast). C. Comparison of p21 mRNA expression in gingival fibroblast treated with CsA. The expression of p21 according to the concentration of CsA was not significant.

4) CsA 농도에 따른 p21의 발현양상

p21과  $\beta$ -actin mRNA 발현 양상은 506bp, 524bp에서 각각 관찰되었다. p21 mRNA 발현양상은  $\beta$ -actin mRNA의 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 정상인 및 과증식된 치은 섬유아세포에서는 CsA의 농도에 따른 p21의 발현의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

비정상적인 치은증식은 phenytoin, nifedipine 등의 약물에 의해 발생할 수 있으며, 임신과 관련된 호르몬 변화와 leukemia, ascorbic acid 결핍과 같은 전신질환에 의해서도 발생할 수 있다고 보고되었다<sup>25-29</sup>. CsA에 의한 치은증식은 1983년 Rateitschak-pluss 등<sup>10</sup>에 의해 처음 보고된 이후 많은 연구자들에 의해 논의되어 왔다. CsA는 신독성, 간독성, 고혈압, 신경독성, 신장과 폐의 섬유화 등 전신적인 합병증을 야기한다. 그리고 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만, 비정상적인 치은증식도 CsA의 주된 합병증으로 보고되었다<sup>1,3-6</sup>. Wirnsberger 등<sup>30</sup>에 의하면 치은 증식은 CsA의 주된 합병증 중 하나이며, CsA를 투여 받는 모든 환자에서 나타나지 않고, 투여환자의 25-80%에서 치은증식을 보인다고 하였으며, 정확한 기전은 아직 알려지지 않고 있다고 한다. CsA를 투여한 모든 환자에서 치은증식이 나타나지

않는 것에 대해서 주요 조직적합유전자복합체(major histocompatibility complex; MHC)과 치은증식의 관련성을 연구한 보고가 있다<sup>31</sup>. 연구결과 HLA(human leukocyte antigen)-DR2는 치은증식의 위험성을 증가시키는 숙주요소이며, HLA-DR1은 치은증식에 대해 보호하는 요소임이 밝혀졌으며, 또한 HLA-DR2가 HLA-DR1보다 더 강하게 작용한다는 것도 알게 되었다. CsA에 의해 유독 치은만이 증식하는 것은 치은 결합조직내의 섬유아세포가 CsA에 민감하기 때문이다. 치간 유두에서 시작하는 치은 증식은 CsA의 투여량보다는 투여기간에 영향을 많이 받으며, 투여 후 6개월 이내에 치은증식의 발병률이 가장 높다고 한다<sup>31-33</sup>. 치은증식이 발생했을 경우 그 심한 정도는 CsA의 혈장 내 농도보다는 기존에 존재하고 있는 치은염이 더 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>34</sup>.

Nash 등<sup>35</sup>은 치은증식의 평가를 임상적인 치관길이, 치은 열구 깊이, 치간 유두의 길이를 기준으로 외과적 술식이 나 약물치료의 결과를 비교하여 보고하였다. 하지만, 많은 증례에서 치료 후 일정 기간 후에 재발이 생기게 되고, 환자는 주로 기능적 또는 심미적인 개선을 위해 내원하는 경우가 많다. 따라서 여러 가지 치주학적인 고려가 치료의 기준에 도움을 주지만, 환자의 기능회복과 심미성을 복합적으로 고려한 임상가의 판단이 중요할 수 있다. CsA에 의한 치은증식의 치료에 대해, Wirnsberger 등<sup>30</sup>은 scaling 등의 구

강 위생 술식은 치은의 건강에는 도움이 될지 모르나, 치은 증식의 치료에는 효과가 없다고 보고하고 있다. 따라서 외과적 치료가 병행되어야 하며, 구강위생 술식과 치은절제술을 병행하였을 경우에도 재발률은 50%에 이른다는 결과를 보고하였다. 약제를 통한 치은증식의 치료에 대해서도 연구되고 있는데, 연구자들은 긴 반감기를 가지는 azalide계 항생제인 azithromycin에 큰 관심을 가지고 있다<sup>37)</sup>. Azithromycin이 치은증식을 감소시키는 기전은 확실히 규명되지는 않았지만, 첫 번째 가설은 조직의 감염을 감소시킨다는 것이고, 두 번째 가설은 azithromycin이 다양한 염증세포, 외피세포, 내피세포, 섬유아세포 등에서 만들어내는 cytokine들에 영향을 주어 섬유아세포의 콜라겐합성을 방해한다는 것이다. Nash 등<sup>35)</sup>에 의하면 azithromycin을 투여 받은 환자의 적어도 67%에서 효과가 있었다고 한다. CsA를 대체할 수 있는 면역억제제로 tacrolimus가 사용되고 있는데, tacrolimus를 투여 받고 있는 환자에서 치은증식은 아직까지 발견되지 않고 있으며, 신장이식환자에서 tacrolimus의 장기간 투여가 안정적이라고 알려지고 있다. Tacrolimus는 치은증식도 억제하지만, 혈중 cholesterol과 triglyceride 수치도 개선시킬 수 있다고 한다<sup>34,36)</sup>.

CsA에 의한 치은증식의 정확한 원인과 발생기전은 밝혀지지 않았지만, 지금까지 보고된 연구결과를 정리하면, 섬유성 증식과 염증성 증식이라는 두 가지 요소가 치은증식을 야기할 것으로 보인다. 염증반응에 원인을 두는 기전으로는 Interleukin(IL)-1이 IL-2 receptor를 가진 세포독성 T-림프구의 전구체를 활성화시키는 과정에서 IL-2에 의한 세포독성 T-림프구의 활성화가 이식의 거부반응을 일으키는데, 이 과정에서 CsA는 T-림프구의 기능을 억제함으로써 면역억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>6,13)</sup>. Leukotriene B4는 염증반응 동안 세포막에서 유래하는 지질의 매개체로서 섬유아세포의 활성화와 결합조직의 turnover rate를 조절한다. 또한 interferon- $\gamma$ 와 IL-2를 자극함으로써 림프구의 기능을 변화시킨다. 혈소판 활성화인은 많은 염증반응과 면역반응에 관여하고 있으며 섬유아세포의 활성화도 증식에 영향을 미칠 수 있다. 보통 leukotriene B4와 혈소판 활성화인은 치주질환에 이환된 곳과 치은 열구액에서 발견되어진다고 보고된 바 있다<sup>25,37)</sup>. Atila 등<sup>32)</sup>은 CsA에 의한 치은 열구액에서의 MMPs와 Neutrophil Elastase의 양을 분석한 후 CsA의 투여는 세포의 기질을 용해하는 PMN-elastase의 수준을 낮추기는 하지만, MMP-8, MMP-9에는 영향을 미치지 못한다고 보고하였다.

섬유성증식은 섬유아세포에 의한 콜라겐과 단백질의 형성 증가와 콜라겐분해효소의 활성화 감소가 주된 원인이며, 여기에는 여러 성장인자/cytokine이 영향을 미친다고 보고된다. 세포외기질의 생성과 합성은 염증이나 생리학적 조건에

따라 조절되는데, 여기에 MMPs의 기능에 대한 많은 연구들이 진행되었고, CsA에 의한 섬유아세포의 반응에서도 MMPs의 발현이 변화되는 것이 보고되었다. MMPs의 활성을 조절하는 inhibitor로 TIMP의 연구들이 진행되고 있는데, MMPs와 TIMP의 발현 양상은 서로 반대되는 경향을 보여 준다. Hyland 등<sup>18)</sup>은 CsA에 의한 섬유아세포에서의 MMP-1, TIMP-1의 mRNA 발현 양상을 관찰한 후, CsA에 의한 콜라겐의 증가는 MMP-1의 발현 감소에 따른 콜라겐 분해의 억제에 의한 것이고, 여기에 TIMP-1에 의한 MMP-1의 억제작용은 관찰되지 않는다고 보고하였다. 하지만, Tuter 등<sup>38)</sup>은 CsA에 의한 섬유아세포의 반응을 정상 치은조직, CsA 투여 후 증식이 없는 정상 치은조직, CsA 투여 후 치은증식이 발생한 환자에서 얻은 섬유아세포에서 CsA에 의한 MMP-1, TIMP-1의 발현을 관찰한 결과 MMP-1의 양상은 차이를 보이지 못하고, TIMP-1의 발현 양상에 유의한 차이를 보인다는 결과를 토대로 CsA에 의한 치은 증식에서 TIMP-1이 MMP-1보다 더 많은 영향을 미친다고 보고하고 있다. Bolzani 등<sup>15)</sup>은 쥐의 섬유아세포에서 CsA에 대한 MMPs의 발현을 관찰한 후, CsA에 의한 치은증식에서 MMP-1, MMP-3이외에도 MMP-2발현의 감소에 의한 억제의 가능성에 대해 보고하였다. Kim 등<sup>39)</sup>은 정상치은 조직과 CsA에 의한 치은증식이 있는 치은조직에서 단백질 발현양상을 면역조직화학적 방법에 의해서 분석한 후 MMP-1의 발현양상에서 두 군 간에 차이는 있으나, TIMP-1의 발현에서는 유의한 차이가 없음을 보고하고 있다. 본 연구결과에서 MMP-1의 발현양상은 CsA 처리 농도에 따라 정상 군에서는 발현 차이가 없었고, 치은 증식 군에서는 약간의 차이를 보였지만, 통계학적인 유의성은 보이지 않았다. 다만, 환자들 사이에서 MMP-1 발현에서 차이를 보여서 이는 MMP-1에 대한 유전적인 차이에서 기인하는 것으로 판단될 수 있고, 이는 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. TIMP-1도 MMP-1과 유사한 결과를 볼 수 있었으나, CsA 750 ng/ml에서 TIMP-1이 유의한 감소를 보이는 것으로 보아서 치은증식에서 있어서 MMP-1의 발현보다는 TIMP-1이 작용할 가능성을 배제할 수가 없을 것으로 생각된다.

TGF- $\beta_1$ 은 세포증식, 세포사멸기전, 세포 분화, 세포외기질의 생성 등의 여러 가지의 생물학적 활성의 조절에 관여하는 다기능 펩타이드이다. TGF- $\beta_1$ 은 병적인 세포외기질의 축적에 의한 조직의 섬유화에서 중요한 조절인자 역할을 한다. CsA의 자극에 의해서 발현된 TGF- $\beta_1$ 은 MMP, TIMP의 생성을 조율할 뿐 아니라, 섬유아세포 증식, 콜라겐 생성들도 자극하게 된다. Cotrim 등<sup>19)</sup>은 정상 섬유아세포에 CsA를 처리하고, TGF- $\beta_1$ , MMP-1, TIMP-1 등의 발현양상을 관찰한 후 TGF- $\beta_1$ 이 autocrine형태의 기전에 의해 인접 섬유아세포의 단백질 분해기능을 저하시킴으로서 치은

증식의 세포외기질 축적을 야기한다고 보고하였다. Gagliano 등<sup>40)</sup>은 치은증식과 치은 섬유아세포의 콜라겐 turnover의 관계에서 CsA의 영향에 대한 연구에서 콜라겐의 축적은 MMP-1의 감소에 의한 것이고, 이때에 TGF- $\beta$ 1의 증가가 동반된다는 것을 보고하였다. Yoshida 등<sup>41)</sup>은 백서의 치은세포에서 성장인자와 CsA과 관련된 성장인자들의 발현에 관한 연구에서 CsA의 자극에 의해서 TGF- $\beta$ 1의 발현이 증가된다고 보고하며 CsA에 의한 콜라겐 대사의 변화와 콜라겐 섬유분해효소의 발현은 TGF- $\beta$ 1의 발현증가에 기인한다고 보고하였다. Cotrim 등<sup>17)</sup>도 antisense에 의한 TGF- $\beta$ 1의 발현 억제 실험에서 TGF- $\beta$ 1의 억제에 따른 콜라겐 분해 효소의 증가를 보고하였다. Kim 등<sup>39)</sup>도 치은 증식 조직의 성장인자의 면역조직화학적 검사에서 정상 치은조직보다 유의한 TGF- $\beta$ 1의 발현 증가를 보고하였다. 본 연구 결과에서도 TGF- $\beta$ 1은 치은 증식 군에서 CsA 처리 농도에 따라 유의한 증가양상을 보이는 것으로 보아, CsA에 의한 치은증식의 콜라겐대사에 있어서는 TGF- $\beta$ 1에 의한 콜라겐 생성 및 분해 조절이 더 중요할 것으로 판단된다.

p21 유전자는 6번 염색체의 short arm에 위치하고 있으며, 21-kD의 단백질을 형성하도록 한다. 정상세포에서 p21단백질은 cyclin/CDK복합체와 PCNA와 사중결합을 이루어 CDK를 방해함으로써 세포주기가 G1에서 S 단계로 넘어가는 것을 조절한다<sup>23)</sup>. 또한 DNA 복제효소 델타를 활성화시키는 PCNA의 기능을 차단하여 DNA 복제를 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 세포주기의 G1 감시관문은 종양억제인자인 p53과 pRB에 의한 두 가지 조절 경로에 의하여 유지되는데, 이 두 경로는 p21과 복잡한 상호 관계를 갖고 있으며, p21은 wildtype의 p53에 의하여 조절되거나, p53과 독립된 기전으로 DNA 손상물질에 의하여 생성이 유도될 수 있다고 보고된다. 즉 p21은 세포의 성장 억제, DNA복구, 세포의 분화 그리고 세포 사멸사에서 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. p53 independent pathway는 p53 knock-out mice의 배아 세포나 인간 promyelocytic HL-60 leukemia cell 등과 같이 p53 결핍된 세포에서 p21단백이 발견됨으로써 그 경로가 증명되었고 이러한 경로로 p21단백 발현을 유도하는 물질로는 PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), TGF- $\beta$ 1이 있다고 보고되었다<sup>42)</sup>. Khanna 등<sup>24)</sup>은 CsA에 의해서 p21의 발현이 증가되고, 이러한 발현의 증가는 조직의 섬유화와 재생에 있어서 중요한 역할을 하는 TGF- $\beta$ 1의 증가와 관련이 있다는 연구들을 보고하였다. Kim 등<sup>39)</sup>의 연구에서도 CsA에 의한 치은증식조직에서 p21의 발현이 증가됨을 보고하였다. 본 연구에서 정상과 치은 증식 군에서 모두 발현에 차이가 없는 것으로 관찰되어 TGF- $\beta$ 1의 발현 증가에 따른 p21의 발현은 치은 증식기전에서는 적용이 되지 않는 것으

로 판단되며, CsA에 의한 치은증식은 섬유아세포의 증식보다는 콜라겐 대사조절에 기인한다고 판단되어 진다. CsA에 의한 치은증식에서 콜라겐의 생성에 관련된 성장인자와 세포분열의 주기를 조절하는 성장인자들의 관련성에 대한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 신장식이으로 면역억제제를 복용하고 있는 환자 중에서 치은증식을 보이는 환자의 치은조직과 정상치은 조직에서 배양된 구강 섬유아세포에서 MMP-1, TIMP-1, p21, TGF- $\beta$ 1 mRNA의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

MMP-1은 치은 증식군에서 CsA 농도에 따라 약간씩의 증가를 보였지만 통계적으로 유의하지 않았다. TIMP-1은 치은 증식 군에서 CsA 250, 500 ng/ml에서 약간의 증가를 보였고, 750 ng/ml에서 유의한 감소를 보였다. TGF- $\beta$ 1은 치은 증식 군에서 CsA 500, 750 ng/ml에서 유의한 증가를 보였다. 정상 및 치은증식에 있어서 p21의 CsA 농도에 따른 발현 변화는 없었다. 결론적으로 CsA에 의한 치은 증식은 치은 섬유아세포의 증식보다는 치은 섬유아세포에서 분비되는 콜라겐 생성 및 분해와 관련된 성장인자의 발현에 의해서 조절된다고 판단되며, 관련된 성장인자 중에서는 MMP-1과 TIMP-1보다는 TGF- $\beta$ 1에 의한 콜라겐 생성 및 분해의 조절이 더 중요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM : Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. *Quintessence Int* 30 : 775, 1999.
2. Kantarci A, Cebeci I, Tuncer O et al : Clinical effects of periodontal therapy on the severity of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 70 : 587, 1999.
3. Tipton DA, Fry HR, Dabbous MK : Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodontal Res* 29 : 401, 1994.
4. Brown RS, Beaver WT, Bottomley WK : On the mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol Med* 20 : 201, 1991.
5. Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS : The pathogenesis of drug induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 23 : 165, 1996.
6. Seymour RA, Jacobs DJ : Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol* 19 : 1, 1992.
7. David-Neto E, Lemos FB, Furusawa EA et al : Impact of cyclosporin A pharmacokinetics on the presence on side effects in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 11 : 343, 2001.
8. Starzl TE, Weil R 3rd, Iwatsuki S et al : The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 151 : 17, 1980.
9. Ryffel B, Donatsch P, Madorin M et al : Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch Toxicol* 53 : 107, 1983.
10. Rateitschak-pluss EM, Hefti A, Lortscher R et al : Initial



- observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 10 : 237, 1983.
11. Friskopp J, Klintmalm G : Gingival enlargement. A comparison between cyclosporine and azathioprine treated renal allograft recipients. *Swed Dent J* 10 : 85, 1986.
  12. Tyldesley WR, Rotter E : Gingival hyperplasia induced by cyclosporin-A. *Br Dent J* 157 : 305, 1984.
  13. Emingil G, Coker I, Atilla G et al : Levels of leukotriene B4 and platelet activating factor in gingival crevicular fluid in renal transplant patients receiving cyclosporin-A. *J Periodontol* 71 : 50, 2000.
  14. Yamada H, Nishimura F, Naruishi K et al : Phenytoin and cyclosporin A suppress the expression of MMP-1, TIMP-1, and cathepsin L, but not cathepsin B in cultured gingival fibroblasts. *J Periodontol* 71 : 955, 2000.
  15. Bolzani G, Della Coletta R, Martelli Junior H et al : Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 35 : 51, 2000.
  16. Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E et al : Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol* 74 : 296, 2003.
  17. Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H et al : Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblast is regulated by transforming growth factor (TGF)-beta1 autocrine stimulation. *J Periodontol* 73 : 1313, 2002.
  18. Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT et al : The effects of cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. *J Periodontol* 74 : 437, 2003.
  19. Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E et al : Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-beta1. *J Periodontol* 74 : 1625, 2003.
  20. Schincaglia GP, Forniti F, Cavallini R et al : Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* 21 : 181, 1992.
  21. Nagase H, Visse R, Murphy G : Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69 : 562, 2006.
  22. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H et al : p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366 : 701, 1993.
  23. Chen J, Jackson PK, Kirchner MW et al : Separate domains of p21 involved in the inhibition of cdk kinase and PCNA. *Nature* 374 : 386, 1995.
  24. Khanna AK, Hosenpud JD : Cyclosporine induces the expression of the cyclin inhibitor p21. *Transplantation* 67 : 1262, 1999.
  25. Maiola MP, McFadyen ML, Connolly C et al : Related Factors influencing phenytoin-induced gingival enlargement. *J Clin Periodontol* 27 : 506, 2000.
  26. Naidoo LC, Stephen LX : Nifedipine-induced gingival hyperplasia : non-surgical management of a patients. *Spec Care Dentist* 19 : 29, 1999.
  27. Tumini V, Di Placido G, D'Archivio D et al : Hyperplastic gingival lesions in pregnancy. I. Epidemiology pathology and clinical aspects. *Minerva stomatol* 47 : 159, 1998.
  28. Weckx LL, Hidal LB, Marcucci G : Oral manifestations of leukemia. *Ear Nose Throat J* 69 : 341, 1990.
  29. Stambaugh RV, Morgan AF, Enwonwu CO : Ascorbic acid deficiency associated with dilantin hyperplasia. *J Periodontol* 44 : 244, 1973.
  30. Wirnsberger GH, Pfragner R, Mauric A et al : Effect of antibiotic treatment with azithromycin on cyclosporin A-induced gingival hyperplasia among renal transplant recipient. *Transplant Proc* 30 : 2117, 1998.
  31. Turkmen A, Ak G, Furuncuoglu Y et al : Relationship between gingival hyperplasia and class II histocompatibility antigens in renal transplant recipients. *Nephron* 84 : 29, 2000.
  32. Atilla G, Sorsa T, Ronka H et al : Matrix Metalloproteinases (MMP-8 and -9) and neutrophil elastase in gingival crevicular fluid of cyclosporin-treated patients. *J Periodontol* 72 : 354, 2001.
  33. Varga E, Mair LH : Medication influencing the development of gingival overgrowth in renal transplant patients. *Transplant Proc* 30 : 2120, 1998.
  34. Kohnle M, Lutkes P, Witzke O et al : Conversion to tacrolimus in cyclosporin A treated patients with gum hyperplasia. *Transplant Proc* 30 : 2122, 1998.
  35. Nash MM, Zaltzman JS : Efficacy of azithromycin in the treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 65 : 1611, 1998.
  36. Kohnle M, Lutkes P, Zimmermann U et al : Conversion from cyclosporin to tacrolimus in renal transplant recipients with gum hyperplasia. *Transplant Proc* 31 : 44s, 1999.
  37. Citterio F, Di Pinto A, Borzi MT et al : Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transrecipients is effective and safe. *Transplant Proc* 33 : 2134, 2001.
  38. Tuter G, Serdar MA, Yalim M et al : Evaluation of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in gingival fibroblasts of cyclosporin A-treated patients. *J Periodontol* 73 : 1273, 2002.
  39. Kim YJ, Hwang KG, Oh Y et al : The growth factors expression of cyclosporin induced gingival overgrowth. *J Kor Maxillofac Plast Recons Sur* 27 : 438, 2005.
  40. Gagliano N, Moscheni C, Dellavia C et al : Effect of cyclosporin A on human gingival fibroblast collagen turnover in relation to the development of gingival overgrowth: an in vitro study. *Biomed Pharmacother* 58 : 231, 2004.
  41. Yoshida T, Nagata J, Yamane A : Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodontol Res* 40 : 11, 2005.
  42. Harada K, Ogden GR : An overview of the cell cycle arrest protein, p21 WAF1. *Oral Oncology* 36 : 3, 2000.

#### 저자 연락처

우편번호 133-792

서울 성동구 행당동

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

황경균

#### Reprint Requests

Kyung-Gyun Hwang

Department of OMFS, College of Medicine, Hanyang University  
 Hangdang-Dong, Sungdong-Gu, Seoul, 133-792, Korea

Tel: 82-2-2290-8676 Fax: 82-2-2290-8673

E-mail: hkg@hanyang.ac.kr

원고 접수일 2006년 7월 5일

게재 확정일 2006년 9월 5일

Paper received 5 July 2006

Paper accepted 5 September 2006