Nifedipine이 인체 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 효과

원광대학교 치과대학 치주과학교실
최종길 · 김재현 · 신형식

Ⅰ. 서 론

Nifedipine은 심장치료에 널리 사용되는 지속성 혈관확장제로 세포막 칼슘통로(calcium channels)를 통한 세포막 내부로의 칼슘유입을 차단하여 심장 혈관민무늬근을 이완시키는 작용을 한다. Diphenylhydantoin, nifedipine과 cyclosporin등의 약물을 장기간 복용하여 발생하는 비염증성 치은비대는 국소적인 자극인자의 유무에 관계없이 구강전체에서 발생하고, nifedipine에 의하여 유발되는 부작용은 어지러움, 홍조, 말초부종, 저혈압, 오심 및 근경련이고, 발현빈도가 약 40% 인것으로 보고되고 있다[1-6].

Nishikawa 등[7](1991)은 관상동맥을 이완시키는 약제인 nifedipine을 장기간 투여했을 때 치은 증식을 보이는 두가지 증례의 보고에서 임상 및 조직병리학적 증상은 항경련제인 diphenylhydantoin에 의한 경우와 유사함을 보고하였다. 한 증례에서 약물의 투여전 이미 염증이 존재하였을 때, 치은조직이 증식된 병소를 외과적으로 제거하고 치면세균과 관리를 하면 약을 계속 복용하여도 좋은 예후를 보여, 기존의 치은염증이 이러한 치주질환의 발생에 관여함을 보여주었다. 또한 다른 증례에서는 nifedipine을 다른 약제로 바꾸었을 때 저절로 치유되어 nifedipine이 치은증식을 유발함을 강하게 암시하였고, 실험내에서 치은증식 환자로부터 배양한 치은섬유모세포의 증식 또는 교원질 합성에는 별다른 효과가 없어 국소적인 염증과 nifedipine의 장기간의 투여가 관찰된 치은증식의 원인임을 암시하였다. Sooriyamoorthy등[6](1990)은 nifedipine 단독 또는 cyclosporin과 같이 복용한 환자의 증식된 치은에서 건강한 치은조직에서 보다 5α-dihydrotestosterone(5α-DHT)의 형성이 뚜렷이 증가하였다고 보고하였다. 또한 Romanos등[8](1993)은 nifedipine에 의하여 유발된 치은증식에서 세포의 기질중 collagen type Ⅰ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ와 Ⅶ 및 fibronectin이 차이를 보였고 건강부와 변형된 치은의 기질이종성이 나타났다고 보고하였다.

최근에 종양과 세포생물학의 연구에서 세포의 분화를 유도하는 제제에 대한 연구가 많이 시행되고 있는데 비타민 A는 라이조좀 효소의 방출을 촉진시켜 라이조좀을 포함하고 있는 세포막에 작용하고, 비타민 A 유도체인 retinoic acid는 세포의 성장과 분화의 과정을 변조시키는 복합물로 세포표면의 steroid hormone, thyroid hormone과 vitamin D_3 등의 receptor에 작용하는 것으로 보고되었다[9-14]. Lawrence 등[15](1960)은 소량의 비타민 A는 상피를 위축시키고 과립층에서는 상피세포의 분열을 증가시켜 비후시켜며 형성장애(dysplasia)는 보이지 않으나, 상피의 각화가 결여되고, 과량의 비타민 A에서는 점막의 화생(metaplasia)을 보이고, 상피세포의 괴사를 관찰하였으며, Bern 등[16](1955)과 우 등[17](1990)도 점막분비세포에 의하여 편평세포암으로 화생(metaplasia)을 증진시킨다고 하였다. 또한, glycyrrhetinic acid는 단핵구를 활성화시키는 물질로 interferon (INF) 또는 interleukin-1(IL-1)과 같은 cytokine들의 분비를 촉진시키며, 흉선세포의 분열을 촉진시키고, 종양 promotor에 의하여 유도된 Epstein-Barr virus(EBV)의 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다[18,19]. 김 등[20](1992)은 phenytoin에 의하여 증대된 치은섬유모세포의 활성이 retinoic acid와 glycyrrhetinic acid에 의해 감소되었고 치은섬유모세포의 형태 또한 둥근모양으로 변화되었다고 보고하였다. 최근

에 nifedipine을 복용하는 환자에서 phenytoin의 부작용과 유사한 임상 및 조직학적 양상이 관찰되었으나 대부분의 연구가 임상 및 조직학적 연구로 정상세포에 미치는 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구의 목적은 정상인에서 채취하여 배양한 건강한 치은섬유모세포를 이용하여 nifedipine이 세포의 형태 및 활성에 미치는 영향을 관찰하여 세포의 분화와 관련이 있는 retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 이에 미치는 영향을 치은 연상 및 치은 연하에서 빈번히 검출되는 그람 음성 편성 혐기성 세균인 *Fusobacterium nucleatum*에서 분리한 내독소의 존재여부에 따라 관찰하고자 하였다.

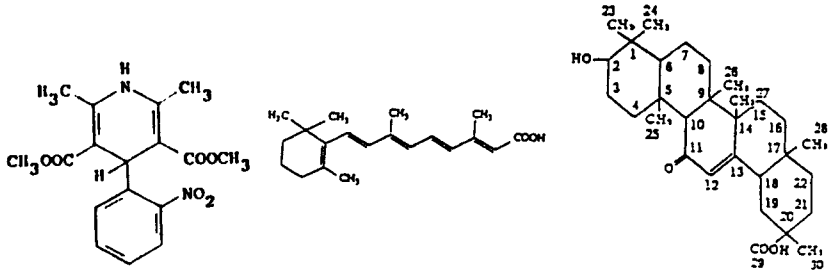
II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험에 사용한 nifedipine(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA), retinoic acid(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA)와 glycyrrhetinic acid(Sigma chemical co., St. Louis, MO USA)를 70% ethanol에 용해시켜 3MM filter로 여과하여 4℃에 보관후 사용하였다(Fig. 1). 본 실험에서 사용한 세균의 내독소는 *Fusobacterium nucleatum* 10953에서 분리한 lipopolysaccharides를 사용하였다. 세균의 배양은 Schaedler배지를 이용하여 냉동 보관중인 균주를 혐기성 배양기(80% N_2, 10% H_2, 10% CO_2 : COY Lab. Products, Ann Arbor, MI, U. S. A)를 이용하여 37℃에서 통상적으로 36시간 혐기성으로 배양하였다. 배양된 세균은 원침(10,000×g, 20min, 4℃)한후 멸균된 생리식염수로 3회 세척한후 증류수로 1회 세척하여 냉동건조 하여다. 건조시킨 균체를 Westphal등[21] (1965)의 방법에 따라 68℃ 증류수 1ml에 균체 20mg이 되도록 하여 분산시킨후 동일한 양의 90%(W/W) 68℃의 phenol(Merck)과 혼합하여 15분간 교반하면서 반응시켰다. 그후 얼음물에 10℃까지 식힌후 10,000×g로 30분간 원침시킨후 상층 수용액 부분을 채취하고 동일양의 증류수를 가하면서 2회반복하여 수집된 수용액 부분을 72시간동안 투석(dialysis) 시킨후 냉동건조하여 내독소를 분리하였다.

1) 치은섬유모세포의 배양

원광대학교 치과대학 부속병원 교정과에 교정치료를 위하여 내원한 10세 전후의 환자 소구치를 발치하면서 발치와 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은을 40% 우태아혈청(fetal bovine serum, GIBCO Co., NY, USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., NY, USA)를 첨가한 α-MEM(GIBCO Co., NY, US)에 3회 세척하였다. 세척한 치은조직을 60mm 세포배양용 Petri dish(Corning Co., NY USA)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No. 15 scalpel 2개를 이용하여 1mm²로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 펴놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37℃, 5% CO_2, 습도 100% 배양기(Sheldon Manufacturing, Inc. Oregon USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 α-MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때 까지 3일 간격으로 교환하였다.



Nifedipine　　Retinoic acid　　Glycyrrhetinic acid

Fig. 1 Structural formula of nifedipine, retinoic acid and glycyrrhetinic acid

2) 이차배양

Petri dish 내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution, GIBCO Co., NY, USA)로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위하여 HBSS를 제거하고, 0.25% Trypsin-EDTA(GIBOC Co., NY, USA)를 dish당 2ml씩 넣고, 3분간 bench 상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 2회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 분주하였다. 분주비율은 1 : 3 내지 1 : 4으로 하고 같은 방법으로 5회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

1) Nifedipine, 세균의 내독소, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 치은섬유모세포 형태에 미치는 영향

5μg/ml의 nifedipine, 세균의 내독소, retinoic acid및 glycyrrhetinic acid를 가한 배양액에서 1일 배양한 후 MEM을 가한 경우, ethanol를 가한 경우, nifedipine을 가한 경우, nifedipine과 세균의 내독소를 가한 경우 및 여기에 retinoic acid나 glycyrrhetinic acid를 가한 경우로 분류하여 도립현미경(inverted microscope, Olympus Co., Japan)을 이용하여 세포형태를 관찰하였다.

2) Nifedipine, 세균의 내독소, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 치은섬유모세포의 활성에 미치는 영향

5μg/ml의 nifedipine, 세균의 내독소, retinoic acid와 glycyrrhetinic acid를 가하여 1일 및 3일 배양한 후, 세포활성을 측정하기 위하여 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigaa Co., St. Louis, USA)용액 50μl를 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT용액을 버리고, DMSO를 50μ씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시켰다[22,23]. Plate를 잘 흔든 후 BLISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)로 630nm를 기준으로 577nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 설정하여 모든 실험결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출한다.

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

3) 통계분석

약물의 존재에 따른 각군의 세포활성의 평균치와 표준오차를 구하고 상호간의 차이를 일원분산분석법(ANOVA)으로 분석하였다.

Ⅲ. 연구결과

1) Nifedipine, 세균의 내독소, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 치은섬유모세포 형태에 미치는 영향

MEM을 첨가한 경우(사진부도 1), nifedipine을 첨가한 경우(사진부도 3) 또는 nifedipine과 세균의 내독소를 첨가한 경우(사진부도 4)의 세포형태는 정상적인 세포돌기를 보였다. 한편 ethanol을 첨가한 대조군(사진부도 2), nifedipine, 세균의 내독소와 retinoic acid를 첨가한 경우(사진부도 5) 및 glycyrrhetinic acid를 첨가한 경우(사진부도 6)의 세포형태는 세포돌기의 소실과 둥근형태의 세포로 변화하였다.

2) Nifedipine이 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향

배양 1일째 nifedipine에 의한 세포활성은 5μg/ml의 농도에서 대조군이 100.00± 21.05에 비하여 125 ± 22.10로 유의하게 증가되었고, 세균의 내독소 존재하에서도 138.15± 11.44로 유의하게 증가되었으나 ($P<0.05$), 배양 3일째에는 대조군과 차이가 없었다 (Table 1).

2) Nifedipine, 세균의 내독소 및 retinoic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향

5μg/ml의 농도에서 배양 1일째 nifedipine에 retinoic acid를 가한 경우의 세포활성은 45.39± 13.07로 nifedipine만을 가한 경우의 125.08± 22.10보다 낮았고, 이러한 retinoic acid의 세포활성 감소는 세균의 내독소가 존재할 때도 26.67± 11.93로 나타났으나 ($P<0.05$), 배양 3일째는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

3) Nifedipine, 세균의 내독소 및 glycyrrhetinic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향

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

Group \ Hours	24 hrs	72 hrs
Cotrol(n=9)	100.00± 21.05	100.00± 2.32
Nif(n=9)	125.08± 22.10*	118.03± 21.67
Nif+LPS(n=9)	138.15± 11.44*	97.27± 30.72

Nif : Nifedipine(5μg/ml)

LPS : Lipopolysaccharide

* : P<0.05 significantly different from control

Table 2. Effect on Nifedipine on the Retinoic acid on the Cell Activity of Human Gingival Fibroblast(Mean % ± S. E.)

Group \ Hours	24 hrs	72 hrs
Cotrol(n=6)	100.00± 21.15	100.00± 2.32
Nif(n=6)	125.08± 22.10*	118.03± 21.67
Nif+RA(n=6)	45.39± 12.07*	117.67± 8.26
Nif+LPS(n=6)	135.15± 11.44*	97.27± 30.72
Nif+LPS+RA(n=6)	28.67± 11.93*	97.00± 11.71

Nif : Nifedipine(5μg/ml)

RA : Retinoic acid(10^{-7}M)

* : P<0.05 significantly different from control

Table 3. Effect on Nifedipine and Glycyrrhetinic on the Cell Activity of Human Gingival Fibroblast(Mean % ± S. E.)

Group \ Hours	24 hrs	72 hrs
Cotrol(n=6)	100.00± 21.15	100.00± 2.32
Nif(n=6)	125.08± 22.10*	118.03± 21.67
Nif+GA(n=6)	73.89± 24.31*	109.48± 8.92
Nif+LPS(n=6)	135.15± 11.44*	97.27± 30.72
Nif+LPS+GA(n=6)	56.06± 33.78*	90.71± 12.64

Nif : Nifedipine(5μg/ml)

GA : Glycyrrhetinic acid(10^{-7}M)

* : P<0.05 significantly different from control

5μ/ml의 농도에서 배양 1일째 nifedipine만을 가한 경우 125.08± 22.10로 대조군에 비하여 유의하게 증대된 반면 nifedipine에 glycyrrhetinic acid를 가한 경우의 세포활성은 73.89± 24.31로 대조군에 비하여 유의하게 낮았다(P<0.05). 이러한 glycyrrhetinic acid의 세포활성 감소는 세균의 내독소가 존재할 때도 56.96± 33.78로 유의하게 낮은 수준으로 나타났다 (Table 3).

Ⅳ. 총괄 및 고안

치은비대는 국소적인 원인의 만성염증에 의하여 발생되는 만성 염증성 비대와 딜란틴을 복용하므로 해서 발생되는 비염증성 비대가 존재한다. 만성 염증성 치은비대는 염증액, 세포 삼출액, 상피와 결체조직의 변성, 새로운 모세관의 형성, 혈관의 울혈, 출혈, 상피와 결체조직 및 새로운 교원섬유의 증식이 관찰되고, 풍부한 섬유모세포와 교원질을 포함한 섬유화가 두드러지고 비교적 견고하게 나타나는데, 치태제거와 치태축적을 용이하게 하는 모든 구강환경 인자의 제거로 완치될 수 있다[5].

Diphenylhydantoin, nifedipine과 cyclosporin등의 약물 복용에 의하여 발생하는 비염증성 치은비대는 국소적인 자극인자의 유무에 관계없이 발생된다고 보고되었는데, 본 연구에서도 *Fusobacterium nucleatum* 10953에서 분리한 내독소의 존재하에서 nifedipine에 의한 세포활성의 증가는 역시 대조군 보다 유의하게 높게 나타났다(Table 1). 이는 세균의 내독소와 무관하게 nifedipine이 세포활성을 증대시킴을 의미한다. 최근에 nifedipine을 복용하는 환자에서 diphenylhydantoin의 부작용과 유사한 변화가 관찰되었고, 임상적 및 조직학적으로도 공통적인 양상이 관찰되었으며, 상하악 전치의 순측치은에 뚜렷하게 나타는데, 무치악 부위에서는 나타나지 않고, 약물 복용을 중단하면 소실됨이 보고되었다[24-32]. 조직학적인 소견에서 뚜렷한 상피증식, 치은섬유모세포의 증식과 결체조직내의 교원질 섬유의 증가가 보고되었다[33]. 그러나 세포활성에 관한 연구에서 배양 1일에는 nifedipine을 가한 군에서는 세포활성이 유의하게 증대되어 diphenylhydantoin과 유사한 시간에

따른 변화로 생각되는데, 배양시간의 지속에 따른 젖산의 증가와 관련이 있는 것으로 생각된다[20,34]. Nifedipine은 세포막 내부로의 칼슘유입을 차단하는 약제로 장기간 투여시 mitochondria의 칼슘유입 통로가 완전히 차단되면 대사요구량에 대한 oxidative phosphorylation의 반응속도가 느려지고, 이는 아마도 mitochondria dehydrogenase의 감소된 칼슘활성 때문일것으로 추측된다. Nishikawa 등[7]은 치은증식이 관찰된 환자에서 국소적인 염증과 nifedipine의 장기간의 투여가 치은증식의 원인임을 암시하였는데, 본 연구에서는 정상인에서 분리 배양한 치은섬유모세포의 세포활성이 nifedipine에 의해 증대됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 건강한 치은섬유모세포의 세포활성의 증대와 치은증식환자에서 치은섬유모세포의 증식 또는 교원질 합성과는 관련이 없이 나타나는 현상으로 추론된다. 이는 치은증식환자의 조직에서 추출한 세포에 대한 세포활성의 연구와 정상세포의 증식및 교원질 합성에 관한 연구가 필요한 것으로 사료된다. 본 연구에서 세균의 내독소를 가하여 세포의 활성을 측정한 결과 nifedipine만을 가하여 배양했을 때와 같이 대조군에 비하여 세포활성이 높은 것으로 나타났는데, 본 연구에서 사용한 *Fusobacterium nucleatum*은 그람 음성의 편성 혐기성 간균으로서 치은연상 및 치은연하에 빈번히 검출되고, 구강내 대부분의 세균이 *Fusobacterium nucleatrm*을 포함하는 그람음성 세균으로 염증이 존재할 때에 나타나는 생체내의 치은증식과 관련이 있을것으로 생각된다[35,36](Table 1). 이러한 세포활성의 변화는 Sooriyamoorthy등[6]이 보고한 nifedipine 단독 또는 cyclosporin과 같이 복용한 환자의 증식된 치은에서 건강한 치은조직에서 보다 증가된 testosterone의 생체활성 형태인 5α-dihydrotestosterone (5α-DHT)의 형성, nifedipine에 의하여 유발된 치은증식에서 세포의 기질의 구성요소 차이 및 건강부와 변형된 치은의 기질 이종성과 관련이 된다.

종양과 세포생물학의 연구에서 세포의 분화를 유도하는 제제에 대한 연구가 많이 시행되고 있는데, 본 연구에서 retinoic acid는 nifedipine에 의해 유발된 세포활성을 감소시켰으며 이는 비타민 A 유도체인 retinoic acid가 세포의 성장과 분화의 과정을 변조시키는 복합물로 세포표면의 steroid hormone, thyroid hormone과 vitamin D_3 등의 receptor에 작용하는 것으로 보고된것[9-14]과 관련이 있는 것으로 생각된다. 본 연구에서 glycyrrhetinic acid 역시 nifedipine에 의해 증대된 치은섬유모세포의 세포활성을 증대시키는 것으로 나타났고, 이는 glycyrrhetinic acid간 단핵구를 활성화시키는 물질로 interferon (INF) 또는 interleukin-1)IL-1)과 같은 cytokine들의 분비를 촉진시키며, 흉선세포의 분열을 촉진시키고, 종양 promotor에 의하여 유도된 EBV의 활성화를 억제하는 것으로 보고된것[18,19]과 관련이 있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 nifedipine 및 세균의 내독소를 가한 경우는 정상적인 세포돌기를 보였으나, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid를 가한 경우는 내독소의 존재와 무관하게 세포돌기의 소실과 등근 세포로 변화하였는데, 이는 retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 정상세포의 세포돌기 소실과 관련되는 것으로 생각된다(사진부도 1-6). 또한, 신선하게 배양한 치은섬유모세포의 세포활성이 nifedipine에 의하여 증대됨을 관찰할 수 있었다(Table 1). 이러한 현상은 이 약물에 대한 수용기가 존재하는 것으로 생각이 되며 이러한 세포활성의 증대는 세포의 성장 및 증식과 관련이 있는 것으로 단일세포의 세포활성 증가와도 관련이 있는 것으로 생각되는데, 이러한 약제에 의한 효과가 mRNA 수준에서의 효과로 생각되고, glycyrrhetinic acid의 효과도 이러한 mRNA 수준의 억제효과로 추정된다[37-40]. 이러한 세포활성의 증가는 증식을 보이는 치은조직에 5α-dihydrotestosterone(5α-DHT)의 형성이 뚜렷이 증가하고, 이와 더불어 5α-DHT에 대한 치은 수용체의 증가가 보고되었으며, 실험실에서 인체 치은섬유모세포 배양을 통한 연구에서 5α-DHT의 생합성이 두배까지 증가한다는 보고와 관련이 있는 것으로 생각된다[41,42].

본 연구에서 단독투여나 5μg/ml의 내독소 존재시에는 세포활성의 증대를 보여서, 이러한 재료가 세포의 세포외기질의 발현과 관련이 있는 것으로 생각된다[43-48]. 이러한 결과는 glycyrrhetinic acid가 cortisone의 antigranulomatus 작용을 경쟁적으로 억제한다는 보고와 관련이 있는 것으로 glycyrrhetinic acid가 세포의 steroid receptor에 작용하여 세포활성의 감소를 유발하는 것으로 생각되어 지는데, 본 연구에서 nifedipine에 의하여 유발된 세포활성이

억제되는 것은 두 약물간에 competition이 조재하여 3, 4-ketosteroid-5-alpha A ring reductase enzyme system의 활성화에 관련이 있는 것으로 생각된다[37-40]. 또한, 이러한 물질이 5α-DHT가 같은 표적 유전자를 발현시키고, 여기에서 만들어진 5α-DHT가 세포에 존재하는 5α-DHT 수용기를 자극하여 세포활성의 변화를 일으키는 것으로 추정된다[46-53]. 향후에는 신선하게 배양한 단일세포에 대한 신호전달 등의 연구가 필요하며 이를 통한 세포의 분화와 관련된 유전자 발현에 관한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

V. 결 론

Nifedipine, 세균의 내독소, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 치은섬유모세포의 세포활성에 미치는 영향을 관찰하고저 도립 현미경을 이용한 세포형태의 관찰과 MTT를 사용한 세포의 활성을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Nifedipine은 치은섬유모세포활성을 증가시켰다.
2. 내독소는 nifedipine에 의하여 증대된 세포활성을 증가시켰다.
3. Retinoic acid와 glycyrrhetinic acid의 투여군에서는 내독소의 존재와 관계없이 세포돌기의 소실을 보였다.
4. Retinoic acid와 glycyrrhetinic acid는 내독소의 존재와 관계없이 nifedipine에 의하여 증대된 세포활성을 감소시켰다.

이상의 연구결과 nifedipine 및 세균의 내독소에 의하여 세포활성의 증가가 나타났고, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid에 의하여 세포활성의 소실을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Heupler FA, Proudfit WL. : Nifedipine therapy for refractory coronary arterial spasm. Am J Cardiol 44 : 798-803, 1979.
2. Moskowitz RM, Prccine PA, Nacareli GV, Zelis R. : Nifedipine therapy for stable angina pectoris : Preliminary results of effects on angina frequency and treadmil exercise response. Am J Cardiol 44 : 816, 1979.
3. Henry PD. : Comparative Pharmacology of calcium antagonists : Nifedipine, verapamil and diltiazem. Am J Cardiol 46 : 1047-1058, 1980.
4. Antman E, Muller J, Goldberg S, et al. : Nifedipine therapy for coronary artery spasm : Experience in 127 patients. N Engl J Med 302 : 1269-1273, 1980.
5. 치주과학교수협의회 : 치주과학 지영문화사 3 : 152, 1992.
6. Sooriyamoorthy M, Grower DB, Eley BM. : Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. J Periodont Res 25 : 25-30, 1990.
7. Nishikawa S, Tada H, Hamasaki A, Kasahara S, Kido J, Nagata T, Ishida H, Wakana Y. : Nifedipine-induced gingival hyperplasia : A clinical and in vitro study. J Periodontol 62 : 30-35, 1991.
8. Romanos GE, Schroter-Kermani C, Hinz N, Herrmann D : Extracelluar matrix analysis of nifedipine-induced gingival overgrowth : immunohistochemical distribution of different collagen types as well as the glycoprotein fibronectin. J Periodont Res 28 : 10-16, 1993.
9. Basset BB, Packer L. : Response of isolated lysozymes to vitamin A. J Cell Biol 27 : 448-450, 1965.
10. Brandes D, Anton E. : Lysosomes in cellular lytic processes III. Electron Histochemical changes in mammary tumors after treatment with cytotoxan and vitamin A. Lab Invest 15 : 987-1006, 1966.
11. Weissmann G, Thomas L. : Studies on lysosomes II. The effects of cortisone on the release of acid hydrolases from a large granule fraction of rabbit liver induced by and excess of vitamin a. J Clin Invest 42 : 661-669, 1963.
12. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. : Transport and storage of vitamine A. Science 250 : 399-403, 1990.

13. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. : A human retinoic acid receptor which belongs to family of nuclear receptors. Nature 331 : 444－450, 1987.
14. Sporn MB, Roberts AB. : Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. Cancer Res 43 : 3034－3040, 1983.
15. Lawrence JD, Bern AH, Steadman GM. : Vitamin A and keratinizing studies on the hamster cheek pouch. Annals of Oto Rhinol Laryngol 69 : 645－660, 1960.
16. Bern HA, Elias JJ, Picket PI, Powers TR, Harkness MN : The influence of vitamin A on the epidermis. Am J Anat 4 : 419－448, 1955.
17. 우건희, 권배근, 신형식 : Aromatic retinoid(Ro 10－9359)가 백서 악하선암에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한치주과학회지 20 : 326－340, 1990.
18. Abe N, Ebina T, Ishida N. : Interferon induction by glycyrrhezin and glycyrrhizin acid in mice. Microbiol Immunol Japan 26 : 535－539, 1982.
19. Mizoguchi Y, Ikemoto Y, Arai T, Yamamoto S. : Effects of glycyrrhizin on antibody production of PWM-stimulated lymhocytes in vitro. Allergie, Japan 33 : 328－335, 1984.
20. 김태경 : Diphenylhydantoin, retinoic acid 및 glycyrrhetinic acid가 치은섬유모세포활성에 미치는 영향에 관한 연구. 원광치의학 3 : 19－34, 1992.
21. Westphal O & K. Jann. Bacterial Lipopolysaccharide : Extraction with Phenol, water and further application of treatment procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry 5 : 83－91, 1965.
22. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65 : 55－63, 1983.
23. Hong WS, Saijo N, Sasaki Y, Minato K, Nakano H, Nakagawa K, Fujimura Y, Nommura K, Twentyman PR. : Establishment and characterization of cisplastin-resistant sublines of human lung cancer cell lines. Int J Cancer 41 : 462－467, 1988.
24. Kimball OP. : The treatment of epilepsy with sodium diphenylhydantoin. J Am Med Assoc 112 : 1244－1245, 1939.
25. Angelopoulos AP, Goaz PW. : Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 34 : 898－906, 1972.
26. Walker CR, Tomich CE, Hutton CE. : Treatment of diphenylhydantoin gigival hyperplasia by electrosurgery. J Oral Surg 38 : 306－311, 1980.
27. Ramon Y, Behar S, Kishon Y, Engelberg IS. : Gingival hyperplasia caused by nifedipine : Aprelimanary report. Int J Cardiol 5 : 195－204, 1984.
28. Lederman D, Lumerman H, Reuben S, Freedman PD. : Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 57 : 620－622, 1984.
29. Bencini PL, Crosti C, Sala F, et al. : Gingival hyperplasia induced by nifedipine : Report of a case. Acta Derm Venereol(Stockholm) 65 : 362－365, 1985.
30. Van der Wall EE, Tuinzing DB, Hes J. : Gingival hyperplasia induced by nifedipine, and arterial vasodilating drug. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 60 : 38－40, 1985.
31. Shaftie AA, Widdup LL, Abate MA, Jacknowitz AI. : Nifedipine-induced gingival hyperplasia. Drug Intell Clin Pharm 20 : 602－605, 1986.
32. Jones CM. : Gingival hyperplasia associated with nifedipine. Br Dent J 160 : 416－417, 1986.
33. Butler RT, Kalkwarf KL, Kaldahl WB. : Drug-induced gingival hyperplasia : Phenytoin, cyclosporin and nifedipine. J Am Dent Assn 114 : 56－60, 1987.
34. Lee JK, Kim KJ, Chung CP, Kim SN, Chung MH. : Lactic acid in cultured supernatant of human gingival fibroblast. J Oral Biol 17 : 15－

19, 1993.
35. Dzink J, Tanner ACR, Haffajee AD, Socransky SS. : Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 12 : 648－114, 1985.
36. Newman MG. : Anaerobic oral and dental infection. Rev Infect Dis 6 : 107－114, 1984.
37. Ebadi MS, Scott PM. : Increase in collagen level by diphenylhydantoin as possible mechanisms of drug-induced gingival hyperplasia. Clin toxicol 4 : 39－46, 1971.
38. Kasai S, Hachimine K. : Effect of 5, 5-diphenylhydantoin sodium on the synthesis of collagen by some fibrolast cell lines including gingiva derived cells. Bulletin of Tokyo Dental College 15 : 53－62, 1974.
39. Vittek J, Gordon GG, Rappaport SC, et al. : Cellular regulation of the metabolism of androgens in rat oral mucosa. Activation of delta 3, 4-ketosteroid-5-alpha A ring reductase enzyme system by 5, 5-diphenylhydantoin. J Dent Res 58 : 642－645, 1979.
40. Tamura Y. : Study of effects of glycyrrhetinic acid and its derivatives on △4-5α and 5β-reductase by rat liver preparations. Folia endocrinol jap 51 : 589－600, 1975.
41. Southren AL, Rappaport SC, Gordon GG, et al. : Specific 5a-dihydrotestosterone receptors in human gingiva. J Clin Endocr Metab 47 : 1378－1382, 1978.
42. Sooriyamoorthy M, Harvey W, Gwer DB. : The use of human gingival fibroblasts in culture for studying the effects of phenytoin on testosterone metabolism. Archs Oral Biol 33 : 353－359, 1988.
43. Bollag W. : Therapy of epithelial tumors with an aromatic acid analog. Chemotherapy, 21 : 236－247, 1975.
44. Mayer H, Bollag W, Hanni R, Ruegg R. : Retinoids, a new class of compounds with prophylactic and therapeutic activities in oncology and dermatology. Experientia 34 : 1105－1119, 1978.
45. Goodman DS. : Vitamin A metabolism. Fed. Proc 39 : 2716－27722, 1980.
46. Goodman DS. : Vitamin A and retinoids : Recent advances, introduction, background, and general view. Fed. Proc 38 : 2501, 1979.
47. Lee HY. : Molecular analysis of the differentiation associated events and screening of new differentiation factors in F9 teratocarcinoma stem cells. Mol. Cells 2 : 149－154, 1992.
48. Kumagai A, Yano S, Otomo M. : Study on the corticoid-like action of glycyrrhizine and the mechanism of its action. Endcrinol Japan 4 : 17－27, 1957.
49. Kumagai a, Yano S, Takeuchi K, Nishino K, Asauma Y, Nanaboshi M, Yamamura Y. : An inhibitory effect of glycyrrhizin on the antigranulomatous action of cortisone, Endocrinology 74 : 145, 1964.
50. Kumagai A, Nanaboshi M, Asanuma Y, Yagura T, Nishino K, Yamamura Y. : Effects of glycyrrhizin on thymolytic and immunosuppressive action of cortisone. Endocrinol Japan 14 : 39－42, 1967(a).
51. Kumagai A, Asanuma Y, Yano S, Takeuchi K, Morimoto Y, Uemura T, Yamamura Y. : Effect of glycyrrhizin on the suppressive action of cortisone on the pituitary adrenal axis. Endocrinol Japan 13 : 234－244, 1966(a).
52. Kumagai A, Nishino K, Yamamoto M, Nanaboshi M, Yamamura Y. : An inhibitory effect of glycyrrhizin on metabolic actions of cortisone. Endocrinal Japan 13 : 416－419, 1966(b).
53. Kumagai A, Nishino K, Shimomura A, Kin T, Yamamura Y. : Effect of glycyrrhizin on estrogen action. Endocrinol Japan 14 : 34－38, 1967 (b).

사진부도 및 설명

사진부도 1. MEM group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular(×16).

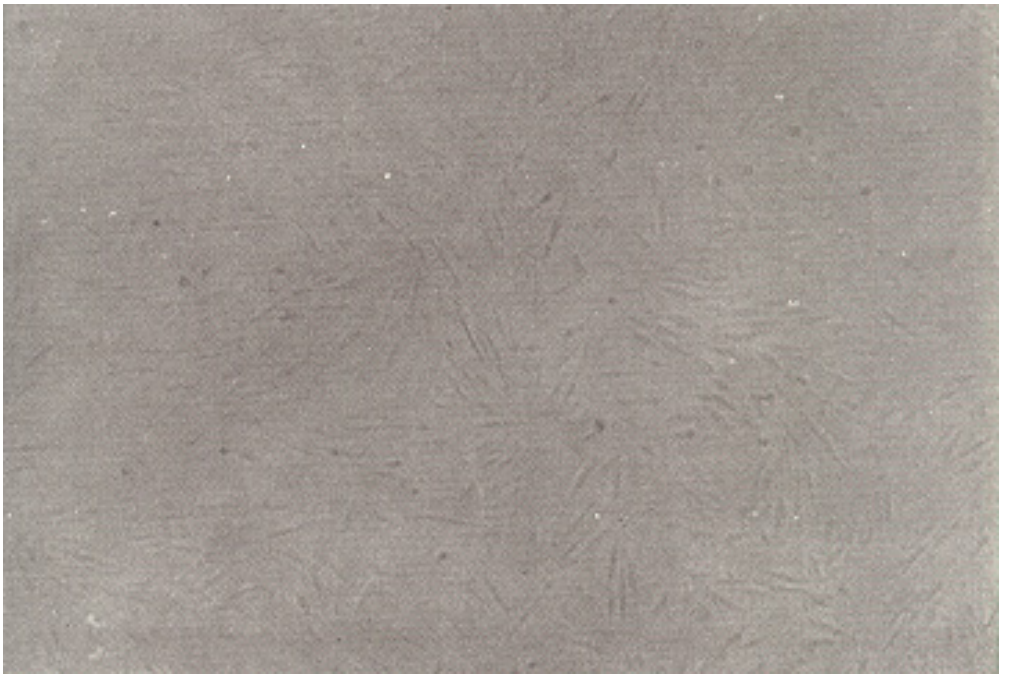
사진부도 2. Control group at 1 day cultivation. The fibroblast cells became globular(×16).

사진부도 3. Nifedipine group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells had their normal stretched cytoplasmic processes(×16).

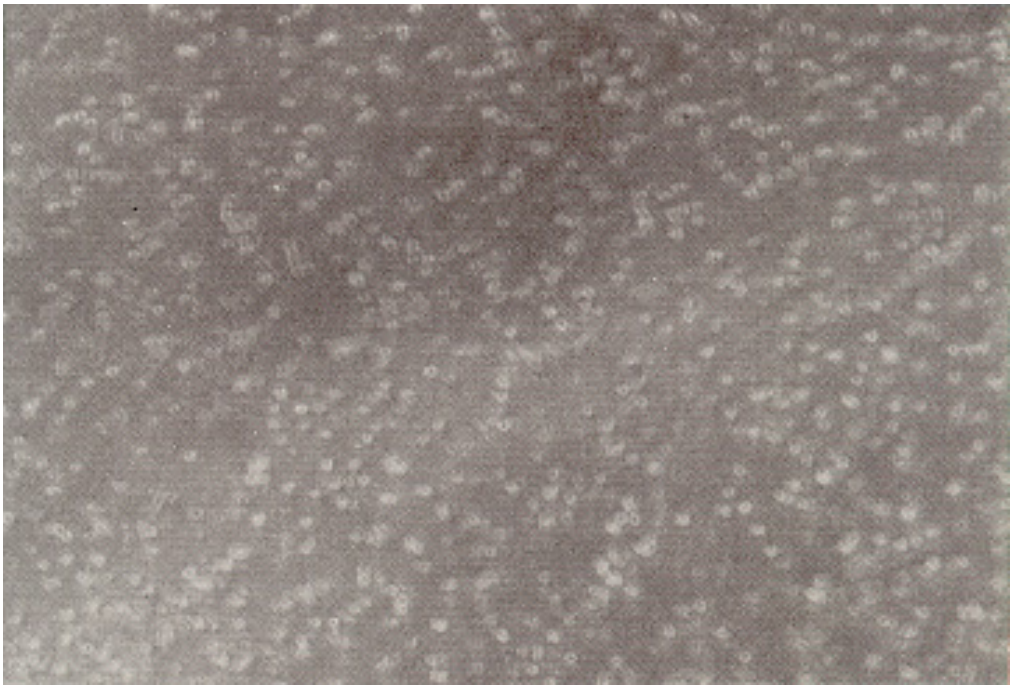
사진부도 4. Nifedipine and lipopolysaccharides group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells had their normal stretched cytolasmic processes(×16).

사진부도 5. Nifedipine, lipopolysaccharides and glycyrrhetinic acid group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular(×16).

사진부도 6. Nifedipine, lipopolysaccharides and retinoic acid group at 1 day after cultivation. The fibroblast cells became globular(×16).

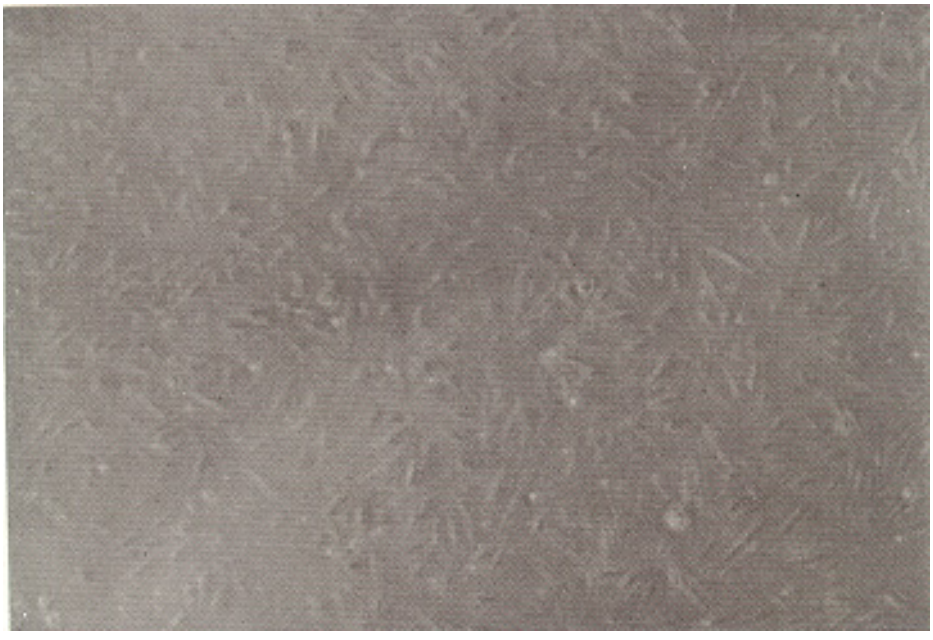


사진부도 1

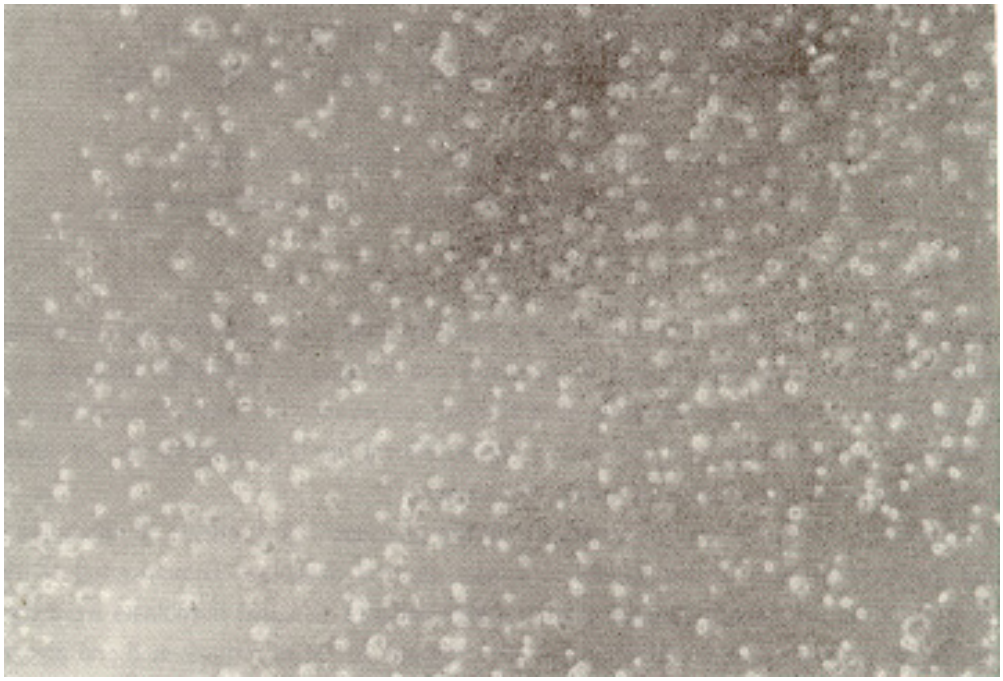


사진부도 2

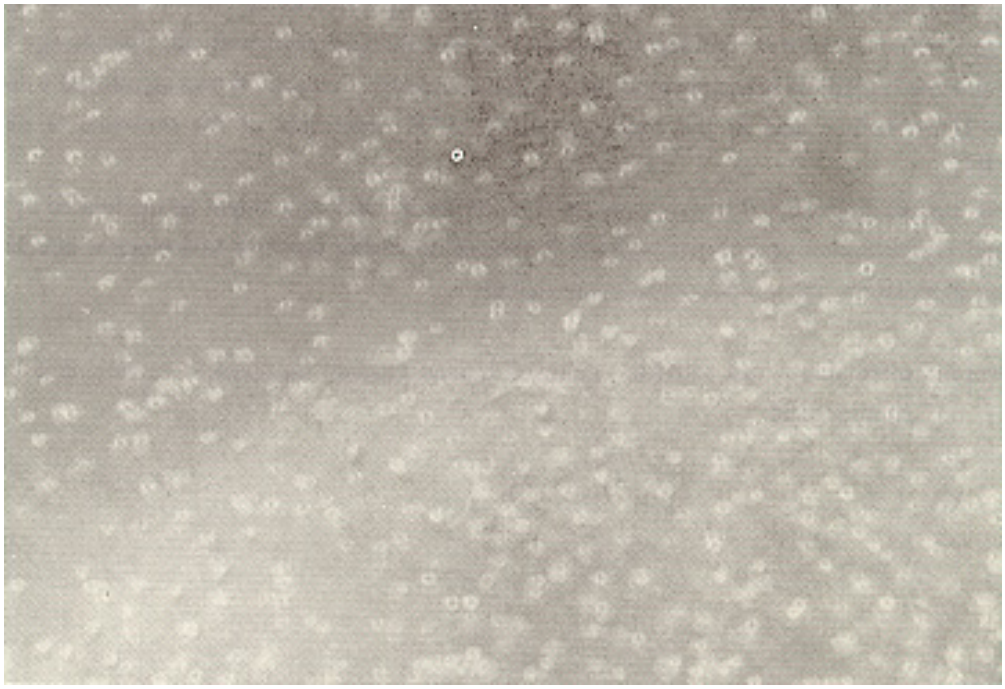
사진부도 3



사진부도 4



사진부도 5



사진부도 6

-Abstract-

THE EFFECTS OF NIFEDIPINE ON THE ACTIVITY OF HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST

Jong-gil Choi, Jai-Hun Kim, Hyung-Shik Shin
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Gingiva is remarkly sensitive to certain drugs. Especially, long term use of phentoin, dihydropyrydine (including nifedipine), cyclosporin and other drugs can be lead to pathologic changes in gingival tissue, especially in terms of proliferation of epithelium and connective tissue. Recent study in terms of proliferation of epithelium and connective tissue. Recent study is focused on the inhibition of drug-induced gingival hyperplasia by using medicaments.

The purpose of this study was to investigate on the pharmacological effects of nifedipine, retinoic acid and glycyrrhetini acid to the activity in human gingival fibroblast. Human gingival fibroblasts were cultured from the healthy gingiva of orthodontic patients. Gingival fibroblasts were trypsinized and cultured in growth medium added 5μg/ml of nifedipine, 10^{+7}M of retinoic acid and glycyrrhetinic acid. The passage number of cultured fibroblasts were between fifth and eighth. The cell morphology was examined by inverted microscope and the cell acitivity was measured by the MTT assay.

Nifedipine at the concentration of 5μg/ml was revealed significantly effective to increase the cell activity and lipopolysaccharide was cofactor to increase cell activity in the presence of nifedipine. However, retinoic acid was significantly effective on the globular change of cell morphology and loss of cell process regardless of the presence of nifedipine and LPS. Cell activity was significantly decreased by the glycyrrhetinic acid at the concentration of 10^{-}M regardless of the presence of nifedipine and LPS.

These results suggested that the increased cell activity by nifedipine might be modulated by retinoic acid and glycyrrhetinic acid. Further study is needed to clarify on their toxicological effects during cellular modulation and mRNA expression change.

Key words : nifedipine ; cell activity ; cultured human gingival fibroblast ; retinoic acid ; glycyrrhetinic acid.