

# Glycyrrhetic acid와 oleanolic acid가 배양 치은 섬유모세포의 cyclosporine A 유도 세포활성에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 치주과학교실  
김영옥 · 김재현 · 신형식

## I. 서 론

Cyclosporine A는 *Trichoderma polysporum* 과 *Cylindrocarpum lucidum*의 대사에 의해 생산된 cyclic polypeptide로써, 이는 interleukin-2등의 cytokine합성 억제제를 통해 면역반응 억제의 특성을 보인다<sup>1)</sup>. 이러한 작용은 장기이식 환자에서 이식 거부를 방지하는데 응용되며 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis)과 심한 건선(psoriasis)등의 다양한 치료에도 이용되고 있다<sup>2,3)</sup>.

면역 반응에 있어 cyclosporine A의 작용 기전은 아직 명확히 알려져 있지 않다. Cyclosporine A는 다른 면역 억제제와는 달리 면역계를 통해 비특이적인 작용을 보이지 않으나, 일반적인 치료용량에서 B림파구에 대한 T림파구의 작용과 이에 따른 환자에서의 선택적 면역억제를 결정하는 제액성 면역반응을 조절하는 직접적인 작용을 보인다. 한편, Cyclosporine A는 T 림파구에 선택적으로 작용하는데 T suppressor cell 보다 cytotoxic T cell과 helper T cell에 더욱 민감하게 반응한다<sup>4)</sup>.

Cyclosporine A의 사용에 있어 많은 부작용이 보고되고 있는데, 가장 흔한 부작용으

로는 신독성<sup>5,6)</sup>, 간독성<sup>7,8)</sup>, 다모증, 약한 경련, 위장장애, 그리고 치은의 과증식등이 보고되었다<sup>9-16)</sup>.

Cyclosporine A 투여 환자에서 보고된 치은의 과증식은 약 8-26%에서 발견되고<sup>17)</sup>, 임상적으로 phenytoin<sup>18-20)</sup>과 nifedipine<sup>21)</sup>같은 다른 약물에 의한 치은증식과 유사한 양상을 보인다. 치은에서의 이러한 증식은 약물치료 개시 후 4-6주 사이에 최초로 나타나고 치간유두에서 시작되어 주로 협측 전정부위 측으로 확장되며 염증, 출혈 그리고 부종이 동반된 치은에서 부터 최소한의 염증을 갖는 섬유성 조직에 이르기 까지 다양하게 나타난다<sup>22)</sup>.

이러한 치은증식에 있어 치태와 같은 국소요인이 어느 정도로 영향을 미치는가를 결정하는것은 중요하며, Rateischak 등(1983)<sup>12)</sup>은 실제로 높은 치태지수를 보이는 불량한 구강위생 상태의 환자에서 더욱 명백하게 나타났다고 보고하였다.

Cyclosporine A 유도 치은증식에 관한 Bartold(1989)<sup>23)</sup>의 보고에 따르면 cyclosporine A는  $10^8 - 10^{10}$  g/ml의 농도에서 정상 치은으로 부터 배양된 섬유모세포의 DNA합성을 직접 증가 시키는 것으로 나타났으며 이때

농도는 cyclosporine A를 투여 받은 환자의 혈장 및 조직에서 발견되는 범위 이내이고<sup>24)</sup>, 세균의 내독소 단독으로는 세포 증식 활성의 억제력을 보이나 cyclosporine A의 투여에 따라 억제 작용이 반전되어 세포 활성이 증가함을 보여 심한 치태 침착 부위에 인접한 조직의 증식 가능성이 있음을 제시하였다.

다양한 종류의 세균 내독소가 섬유모세포와 상피에 세포독성을 보이는데, 이 가운데 *Fusobacterium nucleatum*은 치은 섬유모세포의 부착기전에 강한 억제를 보인다.<sup>25)</sup> 또한 Bartold(1989)<sup>23)</sup>는 *Fusobacterium nucleatum*의 내독소가 존재시 cyclosporine A가 섬유모세포의 DNA 합성을 증가시키는 작용을 보였다고 보고하였다.

최근 약물 유도 치은증식의 기전에 대한 연구에서 Rappaport 등<sup>25)</sup>은 testosterone의 대사가 남성의 건강한 치은에서 주로 나타나는데, 이는 testosterone의 생물학적 활성 형태인 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone으로, 이 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone은 섬유모세포의 생합성 활성을 촉진 시킨다고 보고 하였다. 염증과 증식 치은 조직에서는 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone과 4-androstenedione 합성의 현저한 증가를 보이고 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone에 대한 치은 수용기수의 증가와 관련되는 것으로 알려졌다<sup>27)</sup>. 한편, cyclosporine A 유도 치은 증식환자에서 절제된 치은에서 cyclosporine A가 투여되지 않은 대조군에 비하여 유의하게 증가된 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone은 약물 유도 치은 증식에 있어 증가된 androgen 대사가 중요한 요인이 된다<sup>28)</sup>.

세포 분화를 유도하는 생약물질에 대한 연구에서 glycyrrhizin은 감초(*Glycyrrhiza glabra*)의 주성분으로서 이는 주로 경구투여되고 식품의 감미제로 이용되기도 하며 또

한 한의학에서의 주요 처방 성분이다. Glycyrrhizin은 스테로이드와 구조적으로 유사하고<sup>29)</sup> 항 바이러스 작용을 보이고<sup>30)</sup> 경구 투여시 장내에서 glycyrrhetic acid의 형태로 검출이 된다. Glycyrrhizin은 glycyrrhetic acid로 대사되고 나서 인체 장내세균에 의해 3-epi-18 beta-glycyrrhetic acid가 되는데, glycyrrhetic acid는 단핵구를 활성화시키는 물질로서 interferon 또는 interleukin-1과 같은 cytokine 분비를 자극시키며, 흉선 세포의 분열을 촉진시키고, 종양 promotor에 의해 유도된 Epstein-Barr virus의 활성을 억제 시킨다.<sup>31,32)</sup> 김등(1992)<sup>33)</sup>은 phenytoin에 의해 증대된 치은 섬유모세포의 활성이 retinoic acid와 glycyrrhetic acid에 의해 감소되었고, 치은 섬유모세포의 형태 또한 둥근 모양으로 변화되었다고 보고하였다. 또한, glycyrrhetic acid는 배양된 B16 melanoma cell의 G1에서 S phase 사이를 차단하여 세포의 성장을 억제시켰고 세포의 형태를 변화 시켰다고 보고되었다<sup>34)</sup>. 한편, oleanolic acid는 해열 등의 항염작용과 이노 작용을 갖는 금전초(*Glechoma hederacea*)의 성분으로 Epstein-Barr Virus 발현억제가 retinoic acid와 유사하나 Raji cell에 대한 독성이 약한 것으로 알려졌다<sup>34,35,36)</sup>. Grippo등(1987)<sup>37)</sup>은 oleanolic acid는 retinoic acid가 F9세포내에 존재하는 retinol과 retinoic acid 결합 단백질에 영향을 미쳐 세포의 형태를 변화시키는 것과는 달리 steroid receptor와 결합하여 세포의 형태를 변화시키는 작용기전을 제시하였다. Phenytoin 유도 치은증식에 oleanolic acid가 미치는 영향에 있어 권등(1993)<sup>38)</sup>은 phenytoin에 의해 증대된 치은 섬유모세포 활성이 200 $\mu$ g/ml 농도의 oleanolic acid에 의해 감소되었다고 보고하였다. Glycyrrhetic

acid와 oleanolic acid는 cortisol 및 testosterone를 분해하는 효소인 5 $\beta$ -reductase와 친화력을 지녀 강력한 길항작용을 보여 testosterone대사를 억제하는 약리적 기전이 보고되었다<sup>39)</sup>.

상기 연구를 검토한 결과 cyclosporine A가 치주조직에 미치는 단위세포에서의 영향 규명이 아직 미흡한 상태이다. 따라서, 본 연구에서는 정상인으로 부터 배양한 치은 섬유모세포를 이용하여 cyclosporine A가 DNA합성에 미치는 영향의 평가와 세균의 내독소가 cyclosporine A에 의한 DNA합성에 미치는 영향 및 retinoic acid에 비해 세포독성이 약한 oleanolic acid 및 glycyrrhetic acid가 cyclosporin A 유도 세포활성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

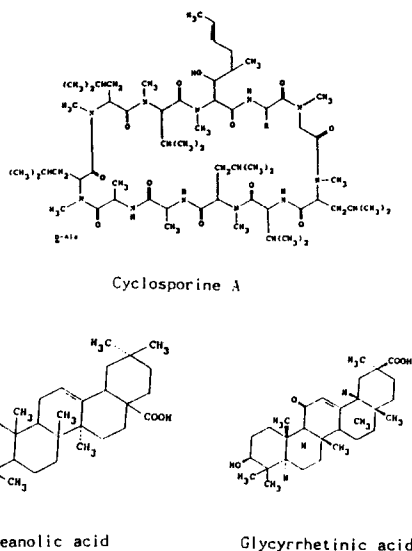


Figure 1 Structural formula of Cyclosporine A, Oleanolic acid and Glycyrrhetic acid

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구재료

1) Cyclosporine A, glycyrrhetic acid와 oleanolic acid의 준비

Cyclosporine A는 고도로 소수성인 성질 때문에 배양액에서는 불용성이다. 따라서 배양단계에서 사용하기 전에 olive oil과 96% 에탄올을 9:1의 비율로 혼합하여 cyclosporine A(Sandimmun, 한국산도스)를 용해하여 10 mg/ml용액을 만들고, 10<sup>-9</sup>g/ml의 농도에 도달하도록 계열 희석하였다.

Glycyrrhetic acid(Sigma Chemical Co. USA)와 oleanolic acid(Sigma Chemical Co., USA)는 200 $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 배양액과 혼합하여 사용하였다.

### 2) 내독소의 분리

본 실험에 사용한 세균의 내독소는 *Fusobacterium nucleatum* 10953에서 분리하여 사용하였다. 세균의 배양은 Schaedler 배지를 이용하여 냉동보관중인 균주를 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 혐기성 배양기(COY Lab Products, USA)를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 36시간 동안 배양하였다. 배양된 세균은 원침(10,000 xg, 20분, 4 $^{\circ}$ C)하여 멸균된 생리식염수로 3회 세척한 후 증류수로 1회 세척하여 냉동건조하였다. 건조시킨 균체를 Westphal과 Jann (1965)<sup>40)</sup>의 방법에 따라 68 $^{\circ}$ C 증류수 1ml에 균체 20mg이 되도록 하여 분산시킨후 동일한 양의 90%(W/W) 68 $^{\circ}$ C의 phenol과 혼합하여 15분간 교반하면서 반응시켰다. 그후 얼음물에서 10 $^{\circ}$ C까지 식힌 후 10,000 x g으로 30분간 원침시킨후 상층 수용액 부분을 채취하고 동일량의 증류수를

가하면서 2회 반복하여 수집된 수용액 부분을 72시간 동안 투석 시킨후 냉동건조하여 내독소를 분리하였다.

## 2. 연구방법

### (1) 섬유모세포의 배양

원광대학교 부속 치과병원 교정과에 교정 치료를 위해 내원한 10세 전후의 환자 소구치를 받치하면서 받치와 주위의 육안적으로 염증이 관찰되지 않은 부위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은을 40% 우태아혈청 (fetal bovine serum, GIBCO Co., USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., USA)를 첨가한  $\alpha$ -MEM(Minimal Essential Medium, GIBCO Co., USA)에서 3회 세척하였다.

세척한 치은조직을 60 mm 세포배양용 배양접시(Corning Co., USA)로 옮겨 건조되지 않도록 주의하면서 No. 15 scalpel을 이용하여 약 1 mm<sup>2</sup>로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직이 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 퍼 놓은후 pipette을 이용하여 각 배양접시당 2 ml의 배양액을 주입하여 37°C 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, SHEL-LAB, USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한  $\alpha$ -MEM을 사용하고 단일세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 교환하였다.

3일간 배양한후 배양접시내의 배양액을 제거하고 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)(GIBCO Co., USA)으로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위해 HBSS를 제거하고, 0.25% trypsin-EDTA(GIBCO Co., USA)를 dish당 2 ml씩 넣고, 3분간 bench상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용하여 배양접시에 부착된 잔여세포를 분

리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 2회 세척한후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 분주비율은 1:3 내지 1:4로 하고 같은 방법으로 4회 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

(2) Glycyrrhetic acid, oleanolic acid, cyclosporine A와 세균의 내독소가 섬유모세포의 형태 및 DNA합성에 미치는 영향

1) Glycyrrhetic acid, oleanolic acid, cyclosporine A와 세균의 내독소가 치은 섬유모세포 형태에 미치는 영향

10<sup>9</sup>g/ml의 cyclosporine A 및 50 $\mu$ g/ml의 세균의 내독소를 가한 배양액에서 3일간 배양한후 MEM을 가한 경우, cyclosporine A를 가한 경우, 세균의 내독소를 가한 경우 그리고 cyclosporine A에 세균의 내독소, glycyrrhetic acid(18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid, SIGMA Chemical Co, USA) 그리고 oleanolic acid(SIGMA Chemical Co, USA)를 함께 가한 경우로 분류하여 도립 현미경(IMT2-21, Olympus, Japan)을 이용하여 세포 형태를 관찰하였다.

2) Cyclosporine A 와 세균의 내독소가 섬유모세포의 DNA합성에 미치는 영향

치은 섬유모세포는 24-well plate에 옮겨진후 부착을 위해 16시간동안 배양되었다. 배양후 plate를 비우고 HBSS로 1회 세척한 다음 10<sup>9</sup>g/ml의 cyclosporine A 및 50 $\mu$ g/ml의 세균의 내독소를 단독 혹은 복합하여 함유한 MEM에서 3일간 배양하였다. 치은 섬유모세포를 상기 농도의 cyclosporine A 및

### III. 연구 결과

세균의 내독소와 함께 3일간 배양한후 2.5μCi/ml의 [6-<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham, Australia Pty Ltd., Australia)을 가하여 8시간 더 배양하였다. 배양이 끝난후 배양액은 조심스럽게 버려지고 HBSS로 3회 세척되었다. 세척된 섬유모세포는 1 ml의 0.5 N의 NaOH를 가하여 50℃에서 1시간동안 세포를 용해시키고 각 well에 3ml의 냉 10% trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 10분간 세포를 고정하였다. 각 표본의 방사선 활성도는 최종적으로 liquid scintillation counter (LS 5000, Beckman, USA)를 이용하여 평가되었다.

3) Glycyrrhetic acid와 oleanolic acid가 cyclosporine A와 세균의 내독소에 의해 유도된 섬유모세포의 DNA합성에 미치는 영향

10<sup>-9</sup>g/ml의 cyclosporine A 및 50μg/ml의 세균의 내독소와 함께 10<sup>-7</sup>M의 glycyrrhetic acid 혹은 oleanolic acid를 치은 섬유모세포에 가하고, 3일간 배양한후 실험용액이 가해지지 않은 치은 섬유모세포를 대조군으로 설정하여 상기 기술한 방법대로 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake assay를 이용하여 DNA합성을 분석하였다.

(3) 통계분석

각 실험에서 얻어진 자료들은 실험 용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 설정하여 모든 실험결과는 대조군의 백분율로 산출하였고, 각 배양일에서의 cyclosporine A 및 세균 내독소의 농도에 따른 각군의 세포생존능력의 평균치와 표준편차를 구한후 각 군간의 차이를 일원분산 분석법(one-way ANOVA)을 이용하여 분석하였다.

(1) Cyclosporine A, 세균의 내독소,

glycyrrhetic acid 및 oleanolic acid

가 치은 섬유모세포 형태에 미치는 영향

대조군(사진 1), cyclosporine A(사진 2) 및 cyclosporine A와 세균 내독소를 동시에 가한군(사진 4)의 치은 섬유모세포가 정상세포 돌기를 보인데 비해 glycyrrhetic acid를 가한 경우(사진 5,7)는 전반적으로 세포 형태를 둥글게 변화되었고, 세포돌기의 소실을 보였으며, oleanolic acid를 가한 경우(사진 6,8) 및 세균 내독소(사진 3)를 가한 경우 일부 세포돌기의 소실 및 둥글어진 형태를 보였다.

(2) Cyclosporine A 와 세균의 내독소가

치은 섬유모세포의 DNA합성에 미치는 영향

10<sup>-9</sup>g/ml의 cyclosporine을 가한 경우 대조군에 비교하여 배양 2일 및 3일에 DNA합성의 증가를 보였다. *Fusobacterium nucleatum*의 내독소를 단독으로 가한 경우 배양 1일 및 3일째에 치은 섬유모세포의 DNA합성을 감소시켰으나, cyclosporine A와 동시 투여시 배양 기간동안 DNA 합성의 억제에는 반전되어 세균의 내독소를 단독으로 가한 군보다 높았고, 배양 1일째에는 내독소를 단독으로 가한군에 비해 통계학적으로 유의한 DNA 합성의 증가를 보였다(P<0.05)(Table 1).

(3) Glycyrrhetic acid와 oleanolic acid가

cyclosporine A와 세균의 내독소에 의해

유도된 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

Table 1. The Effects of Cyclosporine and Lipopolysaccharides on DNA Synthesis of Cultured Human Gingival Fibroblast. (Mean  $\pm$  S.E.) (n=4)

Day Group	1st day	2nd day	3rd day
CTR	100.00 $\pm$ 6.10	100.00 $\pm$ 6.32	100.00 $\pm$ 3.22
CSA	76.18 $\pm$ 5.44	134.19 $\pm$ 27.68	139.58 $\pm$ 14.54
LPS	33.30 $\pm$ 5.18 †	112.30 $\pm$ 12.48	55.84 $\pm$ 5.68
CSA + LPS	91.89 $\pm$ 2.01 ‡	154.10 $\pm$ 25.27 †	90.64 $\pm$ 10.54

CTR : Control

CSA : Cyclosporine A ( $10^{-9}$ g/ml)

LPS : Lipopolysaccharides (50 $\mu$ g/ml)

† : Significantly different from Control (P<0.05)

‡ : Significantly different from Lipopolysaccharides (P<0.05)

Table 2. The Effects of Glycyrrhetic Acid on Cyclosporine-induced DNA Synthesis of Cultured Human Gingival Fibroblasts. (Mean  $\pm$  S.E.) (n=4)

Day Group	1st day	2nd day	3rd day
CTR	100.00 $\pm$ 6.10	100.00 $\pm$ 6.32	100.00 $\pm$ 3.22
CSA	76.18 $\pm$ 5.44	134.19 $\pm$ 27.68	139.58 $\pm$ 14.54
CSA + LPS	91.89 $\pm$ 2.01	154.10 $\pm$ 25.27	90.64 $\pm$ 10.54
CSA + GA	16.16 $\pm$ 6.13 †	14.63 $\pm$ 1.60 †	1.88 $\pm$ 1.24 †
CSA + LPS +GA	22.65 $\pm$ 4.86 ‡	10.76 $\pm$ 3.38 ‡	1.32 $\pm$ 0.73 ‡

CTR : Control

CSA : Cyclosporine A ( $10^{-9}$ g/ml)

LPS : Lipopolysaccharides (50 $\mu$ g/ml)

GA : Glycyrrhetic acid (200 $\mu$ g/ml)

† : Significantly different from Cyclosporine A treated group (P<0.05)

‡ : Significantly different from Cyclosporine A and Lipopolysaccharides treated group (P<0.05)

200 $\mu$ g/ml 농도의 glycyrrhetic acid 는 cyclosporine A 혹은 cyclosporine A와 세균의 내독소와 함께 투여한 경우 DNA합성의 억제를 보였다(p< 0.05)(Table 2).

Cyclosporine에 oleanolic acid를 가한 경

우는 배양 1일과 2일에 cyclosporine을 단독으로 가한 군에 비하여 유의한 수준의 DNA합성의 억제를 보였고 (p<0.05), cyclosporine과 세균의 내독소에 oleanolic acid를 가한 경우는 배양 2일째에 유의한 수준의 DNA합

성의 억제를 보였다 ( $P<0.05$ )(Table 3).

각 배양일에서의 glycyrrhetic acid와 oleanolic acid는 배양 1일째에 cyclosporine A와 함께 배양시 cyclosporine A를 단독으로 가한군에 비하여 유의한 DNA합성의 억제제를 보이며, 여기에 세균의 내독소가 가해

진군은 glycyrrhetic acid의 경우 cyclosporine A와 내독소를 가한 군에 비하여 유의한 DNA합성의 억제제를 보이나 oleanolic acid의 경우 대조군 수준의 DNA합성을 보였다(Fig.2). 배양 2일째의 경우

Table 3. The Effects of Oleanolic acid on Cyclosporine-induced DNA Synthesis of Cultured Human Gingival Fibroblasts. (Mean  $\pm$  S.E.) (n=4)

Group \ Day	1st day	2nd day	3rd day
CTR	100.00 $\pm$ 6.10	100.00 $\pm$ 6.32	100.00 $\pm$ 3.22
CSA	76.18 $\pm$ 5.44	134.19 $\pm$ 27.68	139.58 $\pm$ 14.54
CSA + LPS	91.89 $\pm$ 2.01	154.10 $\pm$ 25.27	90.64 $\pm$ 10.54
CSA + OA	32.83 $\pm$ 4.19 †	16.31 $\pm$ 2.55 †	72.78 $\pm$ 8.79
CSA + LPS +OA	96.22 $\pm$ 6.76	16.30 $\pm$ 1.95 ‡	66.85 $\pm$ 5.63 ‡

CTR : Control

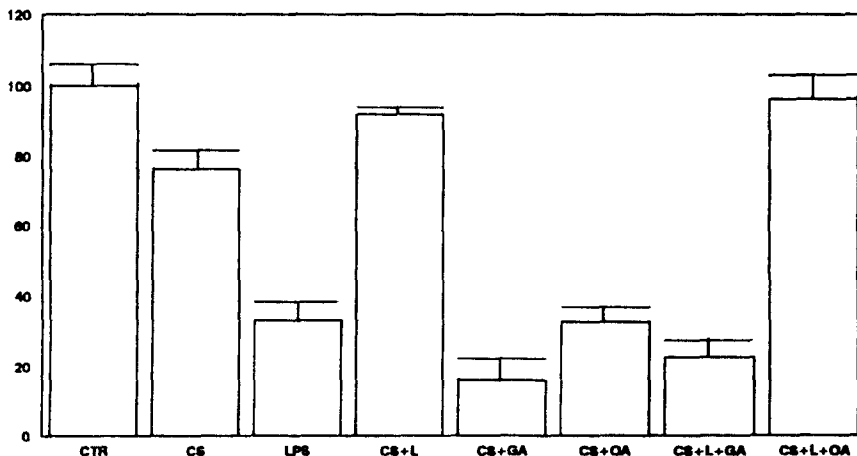
CSA : Cyclosporine A ( $10^{-9}$ g/ml)

LPS : Lipopolysaccharides (50 $\mu$ g/ml)

OA : Oleanolic acid (200 $\mu$ g/ml)

† : significantly different from Cyclosporine treated group ( $P<0.05$ )

‡ : Significantly different from Cyclosporine and Lipopolysaccharides treated group ( $P<0.05$ )



CTR: Control, CS: Cyclosporine A, LPS: Lipopolysaccharides, GA: Glycyrrhetic acid, OA: Oleanolic acid

Figure 2 The effects of cyclosporine, lipopolysaccharides, glycyrrhetic acid and oleanolic acid on DNA synthesis of human gingival fibroblast at 1st day.

glycyrrhetic acid와 oleanolic acid 모두 세균 내독소의 존재 여부와 관계없이 유의한 DNA합성의 억제를 보였다(Fig.3). 배양 3일째에는 glycyrrhetic acid는 세균 내독

소의 존재 여부와 관계없이 DNA합성의 유의한 억제를 보였으나, oleanolic acid는 유의한 수준의 DNA합성의 억제를 보이지는 않았다(Fig.4).

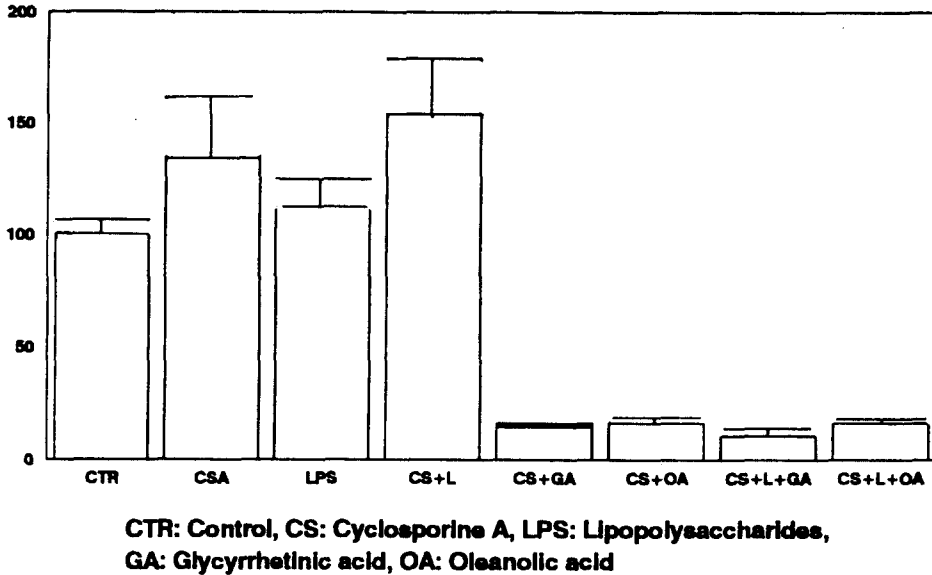


Figure 3 The effects of cyclosporine, lipopolysaccharides, glycyrrhetic acid and oleanolic acid on DNA synthesis of human gingival fibroblast at 2nd day.

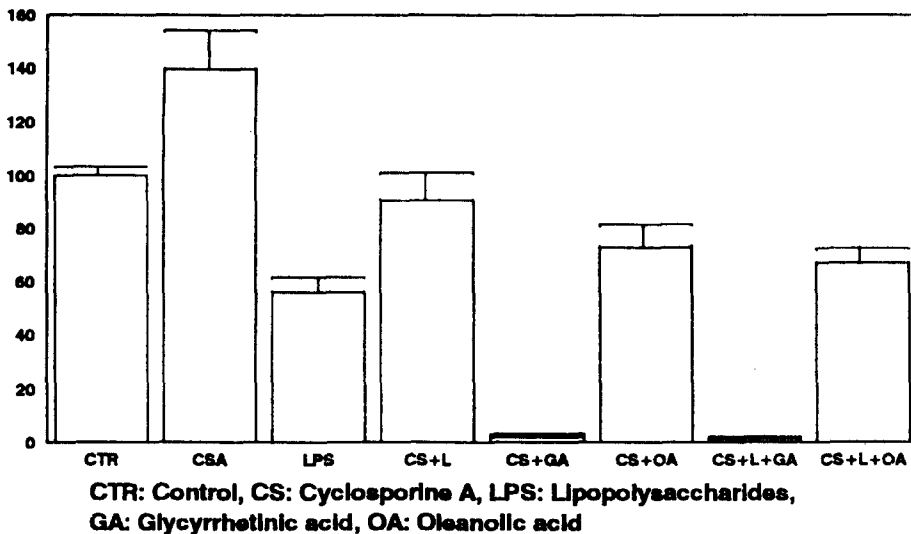


Figure 4 The effects of cyclosporine, lipopolysaccharides, glycyrrhetic acid and oleanolic acid on DNA synthesis of human gingival fibroblast at 3rd day.



#### IV. 총괄 및 고찰

약물투여에 따른 치은증식은 주로 phenytoin<sup>18,20)</sup>, nifedipine<sup>21)</sup>과 cyclosporine A와 같은 약물의 투여와 관련되어 구강내 나타나는 부작용이다.<sup>17)</sup> 이와 같은 약물 유도 치은증식에 대한 연구는 대부분이 phenytoin에 대해서만이 보고되었다. 비록 이들 약물이 나타내는 임상과 조직학적 양상이 유사할 지라도<sup>12,14,15)</sup> 작용 양상은 서로 다르다. Bartold등(1989)<sup>23)</sup>은 cyclosporine A가 섬유모세포의 증식활성을 직접 자극하고 단백질이나 세포의 당단백 합성에 명백한 영향을 보이지는 않으나, phenytoin은 섬유모세포를 직접 자극하지 않고 이의 대사물인 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone이 섬유모세포를 자극하며 단백질합성을 2배 이상 증가시키는 것으로 보고하였다<sup>41)</sup>. 한편, 10<sup>-7</sup> g/ml 이상의 고농도의 cyclosporine은 오히려 치은 섬유모세포의 활성을 억제하며 본 연구에 이용된 농도 이하의 10<sup>-11</sup> g/ml이상의 저농도 또한 대조군 수준의 DNA합성을 보이는 것으로 나타났다<sup>23)</sup>.

이와 같은 cyclosporine A 유도 치은 증식의 직접 및 간접적 원인 규명을 위한 많은 연구가 있었는데<sup>42,43)</sup>, 치은증식이 발생된 cyclosporine A 투여환자의 평균 혈장 cyclosporine A의 농도가 치은증식이 없는 환자의 혈장농도보다 높았다고 보고한 Seymour 등(1987)<sup>44)</sup>을 제외한 대부분의 보고에서 cyclosporine A의 평균 혈장 농도는 치은증식의 발생 유무에 있어 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이에 따른 다른 가능한 국소요인으로 치은 염증이 치은증식의 발생과 밀접한 관련을 보이는 것으로

알려졌다. 치은염증 지수에 관한 Daley등<sup>45)</sup>, McGaw 등<sup>46)</sup> 그리고 Ross 등<sup>47)</sup>의 연구에서 치은염증과 치은증식간의 관계를 보고하였으나 Seymour 등(1987)<sup>44)</sup>은 이와는 달리 치은증식이 치은 염증과 관계없이 발생한다고 보고하였다. Pernu 등(1992)<sup>48)</sup>에 따르면 치은증식의 발생 유무에 있어 연령, 성별, cyclosporine A의 혈중 농도 혹은 cyclosporine A의 투여기간 사이에는 유의한 차이를 발견하지 못하였다고 보고 하였으나 치은염증은 cyclosporine A 투여 환자의 치은증식 발생에 영향을 줄 수 있지만 이러한 외부 국소적 자극 요인 만으로는 그 발생을 설명할 수 없다고 하였다.

치태와 cyclosporine A유도 치은증식의 진행사이의 관계가 보고되고<sup>13,16)</sup>, 치태내 세균의 내독소가 치은염의 진행에 관여하기 때문에, 본 연구에서는 cyclosporine A의 섬유모세포 활성 자극에 있어 세균의 내독소의 역할이 평가되었다. 세균의 내독소가 섬유모세포의 활성에 미치는 영향에 대한 Bartold(1989)<sup>22)</sup> 및 Barber등(1992)<sup>43)</sup>의 보고에 따르면 50 $\mu$ g/ml 농도의 *Fusobacterium nucleatum*의 내독소는 내독소가 가해지지 않은 대조군에 비해 치은 섬유모세포의 증식을 유의한 수준으로 억제하였다. 그런데, cyclosporine A가 존재시 세균의 내독소의 섬유모세포에 대한 증식활성 억제 작용은 반전되어 치은 섬유모세포 활성에 상승작용을 보였다. 이는 본 연구의 배양 2일과 3일에 나타난 결과와 일치하며, 심한 치태 침착이 있는 부위에서 치은증식이 발생할 가능성이 높다는 것을 의미하는 Pernu 등(1993)<sup>48)</sup>의 임상보고와 일치한다.

세포의 분화를 유도하는 제제인 oleanolic acid와 glycyrrhetic acid에 대한 보고에

서, glycyrrhetic acid는 단핵구를 활성화시키는 물질로 interferon 이나 interleukin-1과 같은 cytokine들의 분비를 촉진 시키고, 흉선 세포의 분열을 촉진 시키며, 종양 promotor에 의하여 유도된 Epstein-Barr virus의 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다.<sup>31,32)</sup> 한편 Tokuda등 (1986)<sup>34)</sup>의 보고에 따르면 금전초 추출물인 oleanolic acid는 steroid receptor에 작용하며 이는 retinoic acid보다 세포독성이 약한 것으로 보고되었다. 본 연구에서 glycyrrhetic acid는 대부분의 세포형태를 동글게 변화시키고 세포돌기의 소실을 보였으며, oleanolic acid는 일부의 세포형태를 동글게 변화시키고 세포돌기의 소실을 나타내었는데, 이는 이 약제들이 섬유모세포의 steroid receptor에 결합한 후 표적 유전자에 작용하여 세포형태를 변화시키는 것으로 추정된다. 증식치에 있어 testosterone의 대사에 의해 생산된 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone은 치은 섬유모세포의 활성을 촉진시키는데, Sooriyamoorthy등 (1989)<sup>28)</sup>은 cyclosporine A와 nifedipine투여 환자의 증식치에서 testosterone의 생체활성 형태인 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone의 증가를 보이며 특히 염증이 심한 부위에서 더욱 증가되는 것으로 보고 하였다. Glycyrrhetic acid가 testosterone의 생산에 미치는 영향에 대한 Sakamoto등 (1988)의 보고에 따르면, 10 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 glycyrrhetic acid는 배양 시간에 관계없이 testosterone 생성의 유의한 감소를 보였고 100 $\mu$ g/ml 농도에서는 <sup>14</sup>C-androstenedione이 testosterone으로의 대사에 강한 억제효과를 보였다고 보고하였다. Androstenedione의 농도와 배양시간에 따른 실험에서는 본 실험에서 이용된 농도인 200 $\mu$ g/ml의 glycyrrhetic acid를 가한 경우 시간의 경과와

androstenedione의 농도에 관계없이 일정한 억제양상을 보였다. Glycyrrhetic acid와 oleanolic acid는 cortisol 및 testosterone등의 steroid hormone을 분해하는 효소인 5 $\beta$ -reductase를 억제하는 작용을 보이는데, 이는 5 $\beta$ -reductase의 steroid 수용기에 steroid hormone과 경쟁적으로 부착하여 testosterone 대사의 억제를 보이는 것으로 사료된다. 한편, 본 실험에서 200 $\mu$ g/ml 농도의 glycyrrhetic acid와 oleanolic acid는 cyclosporine A에 의해 증가된 DNA합성을 억제 시켰는데, 이는 cyclosporine A에 의한 세포활성의 증대가 세포의 성장 및 증식과 관련이 있는 것으로 단일세포의 세포활성 증가가 이에 관련되며, 이는 mRNA수준의 효과로 이들에 의한 억제 효과 또한 mRNA수준에서의 억제 효과로 추정된다.<sup>51)</sup> 한편 본 연구에서는 cyclosporine A의 단독 투여나 세균의 내독소와 동시에 가하였을때 DNA합성의 증대를 보였는데, 이는 이 약물이 DNA 합성과 관련이 있으며, glycyrrhetic acid와 oleanolic acid를 가할 경우의 세포활성의 감소는 이들 약물들이 cyclosporine A와 경쟁적으로 작용하는 것으로 생각된다.

이러한 현상은 약물간의 길항작용 및 상승작용에 의한 것이라 사료되며, 이러한 약제를 이용한 동물모형의 개발과 임상연구가 필요한 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Cyclosporine A, 세균 내독소, glycyrrhetic acid 및 oleanolic acid가 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 도립 현미경을 이용한 세포형태의 관찰과 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake assay를 이용한 DNA합

성량을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 치은 섬유모세포의 배양 2일 및 3일째에  $10^9$ g/ml의 농도의 cyclosporine A는 대조군에 비해 DNA합성을 증가시켰다.
- 2) 치은 섬유모세포의 배양 1일 및 3일째에 세균 내독소는 단독 투여시 치은 섬유모세포의 DNA합성을 억제하였으나, cyclosporine A가 혼재한 경우 억제 작용이 반전되어 DNA합성의 증가를 보였다.
- 3) Glycyrrhetic acid와 oleanolic acid는 cyclosporine A 및 세균의 내독소에 의해 증가된 DNA 합성을 억제하였다.
- 4) Glycyrrhetic acid와 oleanolic acid를 가한 경우 치은 섬유모세포는 등글고, 세포의 미세돌기가 소실된 양상을 보였다. 이상의 연구결과 cyclosporine A는 치은 섬유모세포의 DNA합성을 증가 시키는 경향을 보였고, glycyrrhetic acid와 oleanolic acid는 cyclosporine A에 의해 증가된 치은 섬유모세포의 DNA합성에 대한 억제작용을 관찰할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Granelli Piperno. Keane M, Steinmann R. Evidence that cyclosporin inhibits cell mediated immunity promarily at the level of the T lymphocyte rather than the acceswsory cell. *Transplantation* 46(Suppl):535-605, 1988.
2. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF. Cyclosporin; A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann, Intern Med* 101:667-682, 1984.
3. Feutren G. Cyclosporin A:Recent developments in the mechanism of action and clinical application. *Curr Opin Immunol* 2:239-245, 1989.
4. Hess A.D., Turschka, P.J. and Santos, G.W.. The effect of cyclosporine A on T-lymphocyte subpopulations. *Cyclosporin A.ed. D.J.G. White ;pp* 209-232, 1982.
5. Hamilton DV, Evans DB, Thiru S. Toxicity of Cyclosporine A in organ grafting. *White D.ed. Cyclosporine A. Amsterdam:Elsevier, pp* 393-411, 1982.
6. Stiller CR, Keown PA, Sinclair NR, Ulan RA. Immune responses and pharmokinetics in human renal allograft recipients treated with cyclosporin-A. In:Calne RV. *White D.ed. International Symposium on cyclosporin A. New York:Elsvier, pp* 379-387, 1981.
7. Klintman GBG, Iwatsuki S, Starzl TE. Cyclosporine A hepatotoxicity in66 renal allograft recipients. *Transplantation* 32;488-489, 1981.
8. Laupacis A. Keown PA, Ulan RA, Sinclair NR, Stiller NR. Hyperbilirubinemia and cyclosporin A levels. *Lancet* 2;1426-1427, 1981.
9. Bartold PM. Cyclosporine and gingival overgrowth. *J oral Path* 16;463-468, 1987.
10. Bennett JA, Christian JM. Cyclosporine-induced gingival hyperplasia;case report and literature review. *J Am Dent Assoc* 111;272-273, 1985.

11. Friskopp J, Engstrom P-E, Sundqvist K-G. Characterization of mononuclear cells in cyclosporin A induced gingival enlargement. *Scand J Dent Res* 94;443-447, 1986.
12. Rateitschak-Pluss E, Heft A, Lortscher R, Thiel G. Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Perio* 10;237-246, 1983.
13. Rostock MH, Fry HR, Turner JE. Severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. *J Periodontol* 57;294-299, 1986.
14. Savage NW, Seymour GJ, Robinson MF. Cyclosporine-A-induced gingival enlargement. A case report. *J Periodontol* 58;475-480, 1987.
15. Wysocki GP, Gretzinger HA, Laupacis A, Ulan RA, Stiller CR. Fibrous hyperplasia of the gingiva; A side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg* 55;274-278, 1983.
16. Deliliers GL, Santoro F, Polli N, Brune E, Fumagalli L, Riswciotti E. Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 57 ; 771-775, 1986.
17. Beveridge T. Cyclosporin A: An evaluation of clinical results. *Transplant Proc* 15;433-437, 1983.
18. Hassell TM, O'Donnell J, Pearman J, Tesini D, Murphy T, Best H. Phenytoin-induced gingival overgrowth in institutionalized epileptics. *J Clin Periodontol* 11;242-253, 1984.
19. Hassell TM. Epilepsy and the oral manifestations of phenytoin-therapy. In: Myers HM, ed. *Monographs in oral Science*. vol 9. Basel ; S. Karger ; 116-205, 1981.
20. Hassell TM. Stimulation and inhibition of fibroblast subpopulation by phenytoin and phenytoin metabolites ; Pathogenetic role in gingival enlargement. *Pediatr Dent* 3;137-153, 1981.
21. Lederman D, Lumerman H, Reuben S, Freedman PD. Gingival hyperplasia associated with nifedifine therapy. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 57;620-622, 1984.
22. Admas D, Davies G. Gingival hyperplasia associated with cyclosporin A. A reprot of two cases. *Br Cent J* 157;89-90, 1994.
23. Bartold PM. Regulation of human gingival fibroblast growth and synthetic acitivity by cyclosporine-A in vitro. *J Periodont Res* 24;314-321, 1989.
24. Modeer T, Wondimu B, Larsson E, Jonson B. Levels of cyclosporine A in saliva in children after oral administration of the drug in mixture or in capsule form. *Scand J Dent Res* 100;366-370, 1992.
25. Horiba M, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H and Ozeki M. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veilonella* isolated from infected

- root canals. *J Endod* 15;530-534, 1989.
26. Rappaport SC, Vittek J, Altman K. Sex differences in the metabolism of androgens by human gingiva. *J Dent Res.* 55;1371, 1976.
  27. Vittek J, Gordon GG, Rappaport SC. 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.
  28. Sooriyamoorthy M, Gower DB, Eley BM. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. *J Periodont Res.* 25;25-30, 1990.
  29. Teruaki Akao and Taiko Akao. Metabolism of glycyrrhetic acid by rat liver microsomes-III. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 40(5) ; 1208-1210, 1992.
  30. Pompei R, Flore O., Marccialis MA, Panni A and Loddo B. Glycyrrhetic acid inhibits growth and inactivates virus particles, *Nature* 281;689-690, 1979.
  31. Abe N, Ebina T, Ishida N. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhizin acid in mice. *Microbiol Immunol Japan* 26;535-539, 1982.
  32. Mizoguchi Y, Ikemoto Y, Arai T, Yamamoto S. Effects of glycyrrhizin on antibody production of PWM-stimulated lymphocytes in vitro. *Allergie, Japan.* 33;328-335, 1984.
  33. 김태경. Diphenylhydantoin, retinoic acid 및 glycyrrhetic acid가 치은 섬유모세포 활성화에 미치는 영향에 관한 연구. *원광치의학* 3(2);19-34, 1993.
  34. Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito Y. Inhibitory effects of ursolic acid and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbil-13-acetate. *Cancer Letters.* 33;279-285, 1986.
  35. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영종, 김선희. 한약임상응용. 성보사: pp 172-173, 1986.
  36. Lee HY. Molecular analysis of the differentiation associated events and screening of new differentiation factor in F9 teratocarcinoma stem cells. *Mol Cells* 2;149-154, 1992.
  37. Grippo JF, Gudas LJ. The effect of dibutyl cAMP and butyrate on F9 teratocarcinoma cellular retinoic acid-binding protein activity. *J Biol Chem* 262;4492-4509, 1987.
  38. 권오달. 인체 치은섬유모세포에서 Lipopolysaccharides, Ursolic acid와 Oleanolic acid에 의한 Phenytoin 유도 세포활성에 미치는 영향. *원광치의학.* 4(1);1-2, 1994.
  39. Kumagai A, Yano M, Otomo M and Takeuchi K. Study on the corticoid-like action of glycyrrhizin and mechanism of its action. *Endocrinol Jpn* 4;17-27, 1975.
  40. Westphal.O. & K. Jann. Bacterial Lipopolysaccharide: Extraction with Phenol water and further application

- of treatment procedure. methods in carbohydrate chemistry 5;83-91, 1965.
41. Hassell TM, Page RC, Narayanan AS, Cooper CG. Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia; Drug induced abnormality of connective tissue. Proc Natl Acad Sci USA 73;2909-2912,1976.
  42. Odulum O. Prevalence, severity and contributing factors for cyclosporine - A induced gingival hyperplasia. J Dent Res 65(Spec.Issue):740(Abstr 133), 1986.
  43. MT Barber, NW Savage, G J Seymour. The effects of cyclosporin and lipopolysaccharide on fibroblasts; Implications for cyclosporin-induced gingival overgrowth. J periodontol 63;397-404, 1992.
  44. Seymour RA, Smith DG, Rogers SR. The comparative effects of azathioprine and cyclosporine on some gingival health parameters of renal transplant patients-a longitudinal study. J Clin periodontol 14;610-613, 1987.
  45. Daley TD, Wysocki GP, Day C. Clinical and pharmacological correlations in cyclosporin induced gingival hyperplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 62;417-421, 1986.
  46. McGaw T, Lam S, Coates J. Cyclosporin-induced gingival overgrowth; Correlation with dental plaque scores, gingivitis scores and cyclosporin levels in serum and saliva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 64;293-297, 1987.
  47. Ross PJ, nazif MM, Zullo T, Zitelli B, Guevara P, #Effects of cyclosporin A on gingival status following liver transplantation. J Dent Child 56 ; 56-59, 1989.
  48. Hilkka E. Pernu, L.M. Hannele pernu, Kaisa R.H. Huttunen, Pentti A. Nieminen, and Matti L.E. Knuutila. Gingival overgrowth among renal transplant recipients related to immunosuppressive medication and possible local background factors. J Periodontol 63;548-553, 1992.
  49. Ebadi MS, Scott PM. Increase in collagen level by diphenylhydantoin as possible mechanisms of drug-induced gingival hyperplasia. Clin Toxicol 4;39-46, 1971.
  50. Kasai S, Hachimine K: Effect of 5,5-diphenylhydantoin sodium on the synthesis of collagen by some fibroblast cell lines including gingiva derived cells. Bulletin of Tokyo Dental College 15;53-62, 1974.
  51. Tamura Y. Study of effects of glycyrrhetic acid and its derivatives on 4-5 alpha and 5 beta-reductase by rat liver preparations. Folia endocrinol Jap 51; 589-600, 1975.

## 사진부도 및 설명

### 사진 1. 대조군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.

### 사진 2. Cyclosporine A를 단독으로 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포들은 정상적인 형태 및 세포돌기를 보인다.

### 사진 3. 세균의 내독소를 단독으로 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포들은 약간 둥글어진 형태를 보이며 세포돌기들은 부분적으로 소실되었다.

### 사진 4. Cyclosporine A와 세균의 내독소를 동시에 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포들은 정상적인 방추형의 형태 및 세포돌기를 보인다.

### 사진 5. Cyclosporine A와 glycyrrhetic acid를 동시에 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포들은 둥글어졌고, 세포돌기들은 소실되었다.

### 사진 6. Cyclosporine A와 oleanolic acid를 동시에 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포들은 약간 둥글어졌고, 세포돌기들은 부분적으로 소실되었다.

### 사진 7. Cyclosporine A, 세균의 내독소와 glycyrrhetic acid를 동시에 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포는 둥근 형태로 되었고 세포돌기들은 소실되었다.

### 사진 8. Cyclosporine A, 세균의 내독소와 oleanolic acid를 동시에 가한군. (배양 3일째)

치은 섬유모세포는 약간 둥글어졌고 세포돌기들은 부분적으로 소실되었다.

사진1. Control

사진2. Cyclosporine

사진3. Lipopolysaccharide

사진4. Cyclosporine + Lipopolysaccharide

사진5. Cyclosporine + Glycyrrhetic acid

사진6. Cyclosporine + Oleanolic acid

사진7. Cyclosporine + Lipopolysaccharide + Glycyrrhetic acid

사진8. Cyclosporine + Lipopolysaccharide + Oleanolic acid



## THE EFFECTS OF GLYCYRRHETINIC ACID AND OLEANOLIC ACID TO CYCLOSPORINE A INDUCED CELL ACTIVITY OF CULTURED GINGIVAL FIBROBLASTS

Young-Wook Kim, Jae-Hyun Kim, Hyung-Shik Shin

*Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University*

Cyclosporine A is an immunosuppressant commonly used for patients receiving organ transplants. Gingival overgrowth is an adverse side-effect seen in about 8-26% of patients taking cyclosporine A which have been shown to increase the DNA synthesis of gingival fibroblast at the concentration of  $10^{-9}$ g/ml *in vitro*. Glycyrrhetic acid is the active pharmacological ingredients of licorice which exerts steroid-like action and anti-viral activity. Oleanolic acid, which were isolated from *Glechoma hederacea*, has been shown to act as inhibitors of tumor promotion *in vivo* and to be less cytotoxic retinoic acid. This study has been performed to evaluate the effects of glycyrrhetic acid and oleanolic acid on cyclosporine A induced cell activity *in vitro*.

Human gingival fibroblasts were isolated from explant cultures of healthy gingiva of orthodontic patients. Gingival fibroblasts were trypsinized and transferred to the walls of microtest plates. Fibroblasts were cultured in growth medium added  $10^{-9}$ g/ml cyclosporineA and 50 $\mu$ l/ml lipopolysaccharides. Cells between the 4th and 6th transfer in culture were used for this study. The morphology of gingival fibroblast were examined by inverted microscope. The effects of cyclosporine A on the time course of DNA synthesis by human gingival fibroblasts were assessed by [ $^3$ H]-thymidine uptake assays. Cyclosporine A was found to stimulate DNA synthesis of human gingival fibroblast at a concentration of  $10^{-9}$ g/ml. In the presence of lipopolysaccharide derived from *Fusobacterium nucleatum*, addition of cyclosporine A results in reversal of inhibition at the concentration which normally inhibits gingival fibroblast proliferation.

The cell activities in the presence of glycyrrhetic acid and oleanolic acid were decreased, and increased cell activities by cyclosporine A were decreased by glycyrrhetic acid and oleanolic acid at the concentration of 200 $\mu$ g/ml.

These results suggested that the increased cell activities by cyclosporine A modulated by glycyrrhetic acid and oleanolic acid.