

정상 치은 조직에서 배양된 각화세포에서 Cyclosporine A에 의한 MMP-1, TIMP-1, TGF-β의 발현에 관한 연구

강학수¹ · 이재선² · 빙정호¹ · 박창주^{1,2} · 임재중³ · 황경균^{1,2} · 심광섭¹

¹한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, ²한양대학교 의과대학 의생명연구소

³한양대학교 의과대학 치과학교실 치과교정과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:405-411)

THE mRNA EXPRESSION OF MMP-1, TIMP-1, TGF-β₁ IN GINGIVAL KERATOCYTES FROM GINGIVAL HYPERPLASIA INDUCED BY CYCLOSPORINE A

Hag-Soo Kang¹, Jae-Sun Lee², Jung-Ho Bing¹, Chang-Joo Park^{1,2}, Jae-Jung Im³,
Kyung-Gyun Hwang^{1,2}, Kwang-Sup Shim¹

¹Division of Oral and Maxillofacial Surgery/Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang University

²Institute of Biomedical Science, College of Medicine, Hanyang University

³Division of Orthodontics/Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang University

Purpose : Cyclosporine A (CsA) is a versatile immunosuppressive agent used to prevent graft rejection syndrome and treat autoimmune disease. One of the major side effects associated with CsA is the abnormal gingival hyperplasia. The purpose of this study was to investigate the relationship between the mRNA expression of the MMP-1, TIMP-1, and TGF-β₁ and the concentration of CsA in cultured human gingival keratinocytes.

Materials & Methods : Gingival keratocytes were obtained from gingival tissues of 4 healthy donors. The cultured gingival keratocytes were incubated with increasing concentrations of CsA (0-2000 ng/ml) for 24 hours and the expression of MMP-1, TIMP-1, and TGF-β₁ were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results : The expressions of MMP-1 and TGF-β₁ were not significantly different according to the concentrations of CsA. The expression of TIMP-1 was significantly increased at the CsA concentration of 500 ng/ml.

Conclusion : We concluded that the gingival hyperplasia induced by CsA was more related with TIMP-1 than MMP-1 or TGF-β₁ on gingival collagen metabolism in patients treated with CsA.

Key words: MMP-1, TIMP-1, TGF-β₁, cyclosporine A, gingival keratinocyte

I. 서 론

Cyclosporine (CsA)은 임상에서 사용되는 주된 면역억제제로^{1,2}, CsA의 장기간 투여는 신독성, 간독성, 고혈압, 신경독성, 신장과 폐의 섬유화 등의 전신적인 합병증과 구강 내의 비정상적인 치은증식이 발생한다고 보고되고 있다^{3,7}. CsA와 관련된 비정상적인 치은증식은 Starzl 등⁸에 의해 이식수술을 받은 환

자에서 처음으로 보고되었고, 동물실험 결과 개와 고양이에 CsA를 투여 하였을 때 치은 증식이 유도됨도 확인되었고⁹, 이후 많은 연구가 진행되어 왔다¹⁰.

CsA에 의한 치은증식에는 섬유성 증식과 염증 반응이라는 두 가지 기전이 관여한다고 알려져 있으며, 염증 반응에 원인을 두는 기전으로는 CsA가 T형 임파구의 작용을 억제하는 cytokine들의 활성화에 영향을 주는 과정에 작용한다고 한다^{6,11}. 섬유성 증식을 원인으로 보는 연구들에서는 CsA가 여러 cytokine이 섬유아세포에 의한 교원질과 단백질의 형성 증가, 그리고 교원질분해효소의 활성화 감소에 영향을 미친다고 보고하고 있다.

기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)는 아연을 포함하고 있는 세포외 기질 단백 분해효소로서 20 여종로 나눌 수 있으며, 세포외기질 중 세포간질이나 기저막 교원질,

황 경 균

133-791 서울 성동구 행당동 17

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

Kyung-Gyun Hwang

Division of OMFS/Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang Univ.

#17 Haengdang-Dong, Seongdong-Ku, Seoul, 133-791, Korea

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

E-mail: hkg@hanyang.ac.kr

단백당, fibronectin, laminin과 같은 단백질로 구성된 물질을 분해시켜 발육, 성장, 창상의 치유와 같은 결합조직 재형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 금속단백분해효소의 활성은 세포 외적으로 조절할 수 있으며 자연적인 억제인자인 특이성 금속단백분해효소 억제인자(tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinase; TIMP)와의 상호 작용에 의해서 조절된다¹²⁾. TGF- β (transforming growth factors- β)은 창상 치유에 관계되는 많은 세포 활성물질 중에 염증반응과 세포외 기질 축적 등 창상 치유의 모든 과정에서 영향을 미치는 인자로서 많은 교원질을 생산하게 하여 구강 연조직의 재형성 관여를 하게 된다. 이러한 CsA에 의한 치은 증식 기전의 이해는 구강악안면영역의 장기 이식에 유용할 뿐만 아니라, 구강점막의 조직 공학적 연구에도 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

CsA에 의한 치은증식이 교원질의 생성에 관련된 MMP-1, TIMP-1, TGF 등의 단백질과의 관련이 있는 연구들이 현재 많이 진행되고 있고, 이들 단백질의 발현 양상도 유의한 차이들이 관찰되고 있다. 그러나 치은조직에 관한 조직학적 연구를 보면 섬유아세포뿐만 아니라 상피의 각화층 세포도 증가된 것을 관찰할 수 있다. 하지만 CsA의 치은각화세포에 대한 연구와 이들 세포들이 교원질 생성과 흡수에 관여하는지에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 이에 본 연구는 정상 치은조직에서 배양된 치은각화세포에서 CsA의 투여 농도에 따른 MMP-1, TIMP-1, TGF- β 에서 발현정도를 관찰하여, CsA가 치은각화세포에서 치은증식과 관련된 교원질 대사에 관여하는지를 밝히고자 하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구는 한양대학교병원에서 면역억제제를 복용하고 있지 않은 건강한 성인 4명에서 제 3 대구치 발치 시 얻은 정상 치

은조직을 사용하였다. 치은조직의 채취 시에 환자의 동의를 받았고, 이와 관련된 실험에 대한 내용은 한양대학교 병원 기관윤리심의위원회에서 허가를 받았다.

2. 연구방법

1) 세포 배양

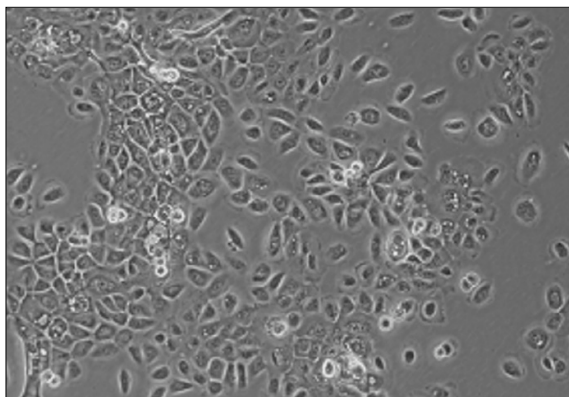
실험에 사용된 정상 및 치은 증식 환자의 치은조직에서 치은 각화세포를 얻었다. 치은 조직을 PBS (phosphate-buffered saline; Gibco, Grand Island, NY, USA)에 여러 번 세척 한 다음 4°C의 dispase II (Roche, Mannheim, Germany)에 18 - 20 시간 담가두었다. 각화 상피층을 분리하고 가위로 잘게 자른 후에 0.05% trypsin-EDTA (Gibco) 용액과 반응시켜 단세포 집단을 얻었다. 이를 모은 후 원심 분리하여 세포층을 얻었다. 얻어진 세포덩어리를 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco)에서 배양하였다. 배양 후 4일째 치은 각화세포가 부착되고 나면, 배지를 keratinocyte growth medium (KGM; Cambrex, USA) 으로 교환하였다(Fig. 1). 각 계대 별로 세포의 수와 활성을 평가하기 위해서 trypan blue 염색을 시행하였다. 실험에서는 첫 번째에서 세 번째 계대의 세포를 사용하였다.

2) Cyclosporine A 처리

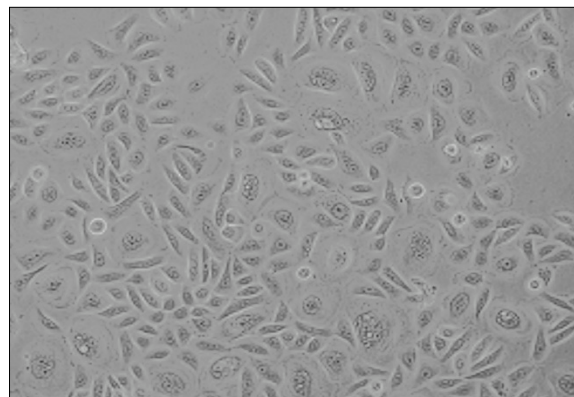
치은 각화세포 (1×10^5 cells/well)에 CsA 농도(ng/ml) 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000으로 24시간 동안 처리하였다.

3) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

mRNA를 추출하기 위해서 먼저 CsA 각 농도로 처리된 세포 배양 well의 상등액을 건어내고, Easy Blue™ (Intron, Seong Nam, Korea)를 각 well 당 1 ml 씩 tube에 넣고 재부유시킨 다음, choloform 200 μ l를 더하여 세계 흔들고 난 뒤 4°C에서 13,000 rpm, 15 분간 원심분리 하였다. 상층에서 400 μ l를 취하여 새로 옮겨 넣



〈정상, passage-0〉



〈치은 증식군, passage-0〉

Fig. 1. Gingival keratinocytes were obtained by incubating from the normal and overgrown gingival tissues. ($\times 100$)

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

Primers	sequences (5' → 3')	Condition	cycle	size	
MMP-1-FW	GGT GAT GAA GCA GCC CAG	95°C	3 min	30	438bp
		95°C	30 sec		
		58°C	30 sec		
		72°C	30 sec		
		72°C	2 min		
MMP-1-RV	CAG TAG AAT GGG AGA GTC	4°C	∞		
		94°C	3 min		
		93°C	45 sec		
		58°C	45 sec		
		58°C	45 sec		
TIMP-1-FW	TGC ACC TGT GTC CCA CCC CAC CCA CAG ACG	72°C	90 sec	40	551bp
		72°C	7 min		
		4°C	∞		
		94°C	3 min		
		94°C	30 sec		
TIMP-1-RV	GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG CCA GGT	55°C	60 sec	34	246bp
		72°C	30 sec		
		72°C	7 min		
		4°C	∞		
		94°C	3 min		
TGF- β 1-FW	AAG TGG ATC CAC GAG CCC AA	94°C	30 sec	25	313bp
		94°C	30 sec		
		57°C	30 sec		
		72°C	30 sec		
		72°C	7 min		
TGF- β 1-RV	GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC	4°C	∞		
		94°C	3 min		
		94°C	30 sec		
		57°C	30 sec		
		72°C	7 min		
GAPDH-FW	GAA GTG GAA GGT CCG AGT C	4°C	∞	25	313bp
		94°C	3 min		
		94°C	30 sec		
		57°C	30 sec		
		72°C	7 min		
GAPDH-RV	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	4°C	∞		
		94°C	3 min		
		94°C	30 sec		
		57°C	30 sec		
		72°C	7 min		

PCR; Polymerase Chain Reaction, MMP; Matrix metalloproteinase, TIMP; Tissue specific inhibitor of matrix metalloproteinase, TGF; Transforming growth factor, GAPDH, Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, FW; forward, RV; Reverse.

고 여기에 isopropanol을 동량 넣어 mRNA를 침전시켰다. 실온에서 10분간 방치한 다음 역시 4°C에서 13,000 rpm, 5분간 원심 분리한 뒤 상등액을 걷어내고, 마지막으로 75% ethanol을 넣어 4°C에서 10,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 mRNA를 얻었다.

추출된 mRNA를 cDNA로 변환시키기 위해서 mRNA를 70°C의 0.5 μ g random nonamer (Genotech, Daejeon, Korea)에서 5분 동안 반응시킨 후 4°C에서 냉각시켰다. 다음 mRNA-nonamer를 10 mM dNTP mix (Intron) 1 μ l, reverse transcriptase M-MuLV (MBI Fermentas, Hanover, MD, USA) 1 unit, 5X M-MuLV dilution buffer (MBI Fermentas) 4 μ l, 그리고 RNase inhibitor (MBI Fermentas) 0.5 μ l와 섞고 20 μ l에 되도록 nuclease-free water (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 이 혼합물을 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 72°C에서 10분, 4°C에서 5분으로 incubation하였다. PCR은 2 μ l의 cDNA에 2.5 mM dNTP mix (Intron) 2 μ l, 10 X Taq buffer (Intron) 2 μ l, Taq polymerase (Intron) 0.2 μ l, 10 pmol 각 유전

자에 맞는 forward 및 reverse primers를 사용하여 시행하였다. GAPDH, MMP-1, TIMP-1과 TGF- β 1의 cDNA는 각각의 specific primer쌍을 사용하였다. 정확한 mRNA 양을 측정하기 위해서 GAPDH 발현을 관찰하였다. 사용된 각각의 primer들은 Table 1과 같다. PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 10 μ l씩 취하여 6X loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 3.0% glycerol in water) 2 μ l와 혼합하여 agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 Gel-Doc (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에서 분석하였다. 각각의 샘플에서 나온 target mRNA transcripts는 GAPDH band intensity의 상대적인 비율로 계산하였다.

4) 통계처리

결과는 실험에서의 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

CsA의 농도에 따른 MMP-1 mRNA의 발현양상을 관찰하기 위해서 각각 4명에서 배양된 치은 각화세포(Normal 1, 2, 3, 4)에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml으로 24시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 다음 MMP-1과 GAPDH mRNA의 발현을 보기 위해서 RT-PCR을 시행하였다. MMP-1과 GAPDH mRNA 발현 양상은 438 bp, 313 bp에서 각각 관찰되었다. MMP-1 mRNA 발현양상은 GAPDH mRNA 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 치은 각화세포에서는 CsA의 농도에 따른 MMP-1의 발현변화는 나타나지 않았고, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2).

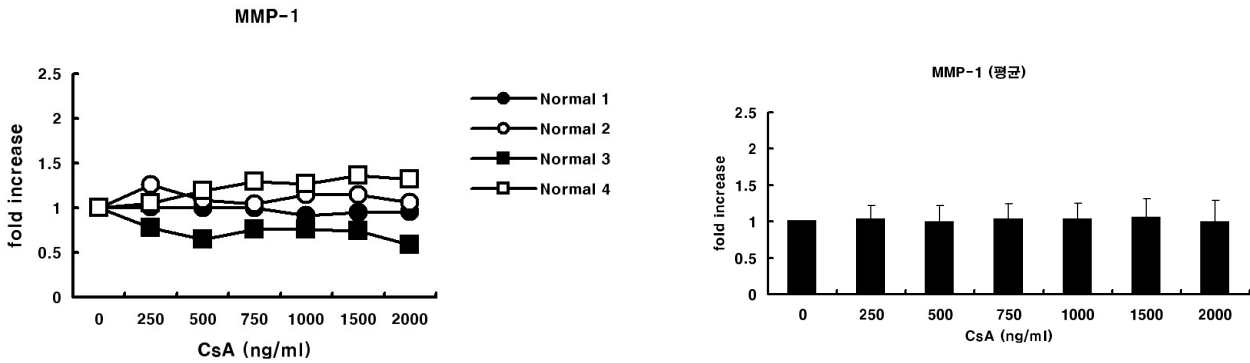


Fig. 2. Effects of CsA on expression of MMP-1 by human gingival keratinocytes. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to MMP-1 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain. The expression of MMP-1 according to CsA concentration was not statistically significant.

2) CsA 농도에 따른 TIMP-1의 발현양상

CsA의 농도에 따른 TIMP-1 mRNA의 발현양상을 관찰하기 위해서 각각 4명에서 배양된 치은 각화세포(Normal 1, 2, 3, 4)에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ng/ml으로 24시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 다음 TIMP-1과 GAPDH mRNA의 발현을 보기 위해서 RT-PCR을 시행하였다. TIMP-1과 GAPDH mRNA 발현 양상은 551 bp, 313 bp에서 각각 관찰되었다. TIMP-1 mRNA 발현양상은 GAPDH mRNA의 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 배양한 치은 각화세포에서는 CsA의 농도가 증가함에 따라서 TIMP-1의 발현은 500, 1000 ng/ml에서 증가하였고 농도 500 ng/ml에서는 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 3).

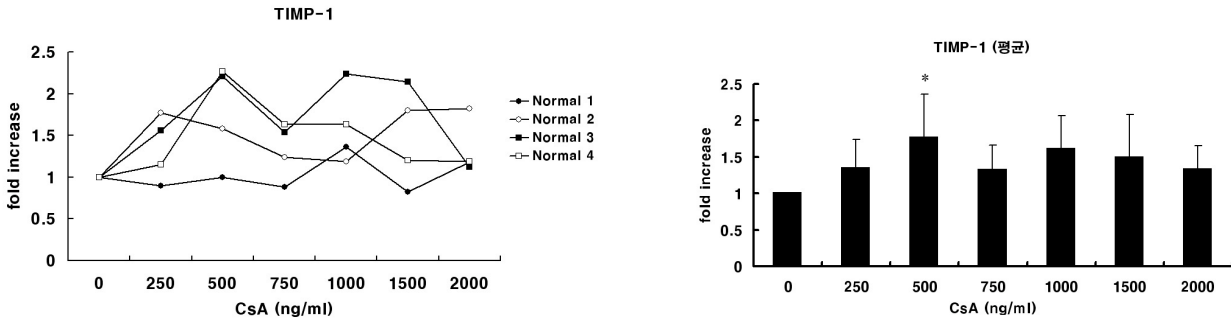


Fig. 3. Effects of CsA on expression of TIMP-1 by human gingival keratinocytes. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to TIMP-1 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain. The expression of TIMP-1 was significantly increased at CsA concentration of 500 ng/ml (* p (0.05)).

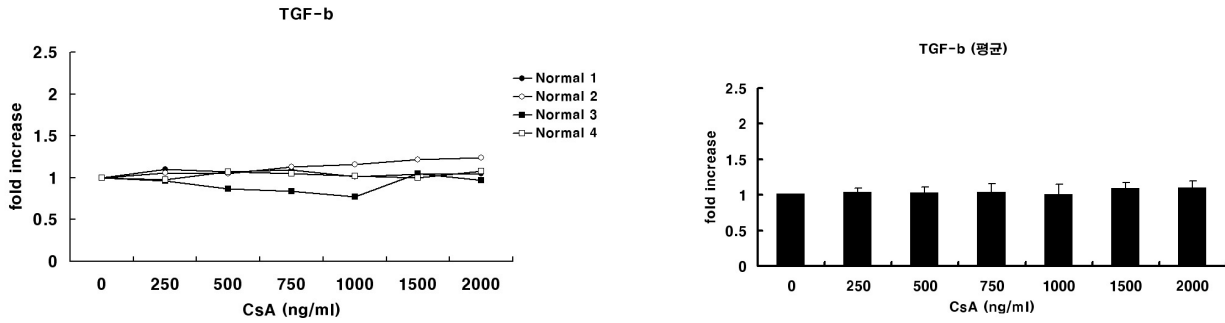


Fig. 4. Effects of CsA on expression of TGF- β 1 by human gingival keratinocytes. Total mRNA was isolated and cDNA was synthesized by reverse transcriptase. After amplification using specific primers to TGF- β 1 and GAPDH, the products were resolved in an agarose gel and ethidium bromide stain. The expression of TGF- β 1 according to CsA concentration was not statistically significant.

3) CsA 농도에 따른 TGF- β 1의 발현양상

CsA의 농도에 따른 TGF- β 1 mRNA의 발현양상을 관찰하기 위해서 각각 4명에서 배양된 치은각화세포(Normal 1, 2, 3, 4)에 CsA의 농도를 0, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000ng/ml으로 24시간 처리하였다. 전체 mRNA를 추출한 다음 TGF- β 1과 GAPDH mRNA의 발현을 보기 위해서 RT-PCR을 시행하였다. TGF- β 1과 GAPDH mRNA 발현 양상은 246 bp, 313 bp에서 각각 관찰되었다. TGF- β 1 mRNA 발현양상은 GAPDH mRNA의 발현의 density를 기준으로 표준화하였다. 치은각화세포에서 CsA의 농도에 따른 TGF- β 1의 발현의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

IV. 총괄 및 고찰

비정상적인 치은증식은 치주조직의 병변 이외에도 약물, 호르몬 변화, 백혈병, 비타민 결핍과 같은 전신질환에 의해서도 발생할 수 있고¹³⁻¹⁷, 이 중 CsA에 의한 치은증식은 Rateitschakpluss 등¹⁰에 의해 처음 보고된 이후 많은 연구자들에 의해 논의되어 왔다. CsA에 의해 유독 구강 내 치은만이 증식하는 것은 특히 치은 결합조직내의 섬유아세포가 CsA에 민감하기 때문으로 추정되나 정확한 연구는 미비한 실정이다. 치간 유두에서 시작하는 치은 증식은 CsA의 투여량보다는 투여기간에 영향을 많이 받으며, 투여 후 6개월 이내에 발병률이 가장 높다고 한다¹⁸⁻²⁰. 치은증식이 발생했을 경우 그 심한 정도는 CsA의 혈장 내 농도보다는 이미 존재하고 있는 치은염이 더 영향을 미친다고 보고되고 있다²¹. Nash 등²²은 치은증식의 평가를 임상적인 치관길이, 치은 열구 깊이, 치간 유두의 길이 등을 기준으로 치료의 결과를 비교하여 보고 하였는데 많은 증례에서 치료 후 일정 기간 후에 재발이 생기게 되고, 환자는 주로 기능적 또는 심미적인 개선을 위해 내원하는 경우가 많았다. CsA에 의한 치은증식의 치료에 대해 Wimsberger 등²³은 치석제거술 등의 구강위생 술식은 치은의 건강에는 도움이 될지 모르나, 치

은증식의 치료에는 효과가 없다고 보고하고 있다. 따라서 외과적 치료가 병행되어야 하나, 구강위생 술식과 치은절제술을 병행하였을 경우에도 재발률은 50%에 이른다고 보고하였다.

CsA에 의한 치은증식은 염증성 증식과 섬유성 증식이라는 두 가지 기전이 작용할 것으로 보인다. 염증반응에 중점을 두는 기전에서는 IL (Interleukin)-1이 IL-2 수용체를 가진 세포독성 T-림파구의 전구체를 활성화시키는 과정에서 IL-2에 의한 세포독성 T-림파구의 활성화가 이식의 거부반응을 일으키는데, 이 과정에서 CsA가 작용할 것이라고 가정한다^{6,11}. 또한 혈소판 활성화인자는 많은 염증반응과 면역반응에 관여하는데 이는 섬유아세포의 활성화도나 증식에도 영향을 미칠 수 있다. 보통 leukotriene B4와 혈소판 활성화인자는 치주질환에 이환된 곳과 치은 열구액에서 발견되어진다고 보고된 바 있다^{13,24}.

CsA에 의한 치은증식이 치은조직의 섬유성증식에 기인한다는 보고들은 섬유아세포에 의한 교원질과 단백질의 형성증가, 그리고 교원질분해효소의 활성화 감소가 주된 원인이며, 여기에는 여러 단백질과 cytokine 등이 영향을 미친다고 한다. 세포외기질의 생성과 합성은 MMPs들에 의해서 조절되고, CsA에 의해서 섬유아세포의 MMPs 발현 양상이 달라진다는 보고들이 있다. 이러한 MMPs의 활성을 억제하는 단백질로 알려진 TIMPs의 섬유아세포에서 조절기전에 대한 연구들도 활발히 진행되고 있다. Hyland 등²⁵은 CsA에 의한 섬유아세포에서의 MMP-1, TIMP-1의 mRNA 발현 양상을 관찰한 후, CsA에 의한 교원질의 증가는 MMP-1의 발현 감소에 따른 교원질 분해의 억제에 의한 것이고, 여기에 TIMP-1에 의한 MMP-1의 억제작용은 관찰되지 않는다고 보고하였다. 그러나 Tüter 등²⁶은 CsA에 의한 치은 증식에서 TIMP-1이 MMP-1보다 더 많은 영향을 미친다고 보고하고 있다. Kim 등²⁷은 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 차이

가 없음을 보고하고 있다.

그러나 위의 연구들은 주로 치은증식을 결합조직 내의 섬유아세포에 의한 교원질 성분의 증가와 감소에만 초점이 되어 있다. 임상적으로도 치은증식의 경우 결합조직 내의 증식과 더불어 상피층의 결합조직 내로의 증식이 관찰되는데 이번 연구는 위의 연구들과는 달리 상피조직 내의 각화세포에서의 교원질 대사와 관련된 MMP와 TIMP의 관련성에 대한 연구에 중점을 두고 시행하였다. 본 연구 결과를 보면, 치은각화세포에 관한 연구에서는 MMP-1은 CsA 처리 농도가 증가함에 따라 유의성 있는 발현 차이가 없었으나 TIMP-1은 CsA 500 ng/ml과 1000 ng/ml 처리 군에서 발현이 증가되었으며 특히 500 ng/ml 처리 군에서는 통계적으로도 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 이는 CsA에 의한 치은증식이 MMP-1의 교원질 분해를 통한 상피층 또는 결합조직으로의 침윤성 증식보다는 TIMP-1의 상피층 내에서의 교원질 분해억제를 통한 상피층 증식으로 인하여 발생할 수 있다는 가능성을 제시한다고 할 수 있겠다. 그러나 실험 구성 상 건강한 환자의 치은에서 채취한 각화세포에 직접적으로 CsA를 처리하였고 임상적으로 CsA가 장기적으로 사용된과는 달리 24시간 처리하였으므로 단기간의 효과에 한정될 수 있는 생체 외 실험(in vitro)결과여서 해석에는 논란이 있을 수 있다.

TGF- β 1의 기능은 세포증식, 세포사멸기전, 세포 분화, 세포외 기질의 생성 등으로 병적인 세포외기질의 축적에 의한 조직의 섬유화에서도 중요한 조절인자 역할을 한다. CsA의 자극에 의해서 발현된 TGF- β 1은 MMP와 TIMP의 생성을 조율할 뿐 아니라, 섬유아세포 증식, 교원질 생성들도 자극하게 된다. Cotrim 등²⁸⁾은 정상 섬유아세포에 CsA를 처리한 연구에서 TGF- β 1이 autocrine형태의 기전에 의해 인간 섬유아세포의 단백질 분해기능을 저하시킴으로서 치은증식의 세포외기질 축적을 야기한다고 보고하였고, Gagliano 등²⁹⁾은 CsA의 의한 교원질의 축적은 MMP-1의 감소에 의한 것이고, 이때에 TGF- β 1의 증가가 동반된다는 것을 보고하였다. Yoshida 등³⁰⁾은 백서의 치은세포에서 CsA의 자극에 의해서 TGF- β 1의 발현이 증가를 관찰하고 CsA에 의한 교원질 대사의 변화와 교원질 섬유분해효소의 발현은 TGF- β 1의 발현증가에 기인한다고 보고하였다. Cotrim 등³¹⁾도 antisense에 의한 TGF- β 1의 발현 억제 실험에서 TGF- β 1의 억제에 따른 교원질 분해 효소의 증가를 보고하였다. 그러나 이들 연구는 주로 치은의 섬유아세포만에서의 관찰이고 상피층의 각화세포에서의 TGF- β 1의 발현 양상에 대한 연구는 미비한 실정이다. Kim²⁷⁾ 등의 연구결과를 보면 CsA에 의해 증식된 조직에서 TGF- β 1발현이 상피와 결합조직의 연결 부위에서 발현되는 것으로 보면 각화세포와 섬유아세포 간의 연관을 추측할 수 있다. Kim³¹⁾ 등은 CsA에 의한 TGF- β 1의 발현의 증가가 배양된 치은 섬유아세포에서 관찰되는 것으로 보고하고 있으나 이번 실험에서 배양된 치은각화세포에서의 TGF- β 1은 CsA 처리 농도에 따라 유의한 변화양상을 보이지 않았으며 MMP-1 또는 TIMP-1의 발현양상과도 별다른 관련성이 없는 것으로 나타났는데 이는 TGF- β 1가 CsA에 의한 치은각화세포의 교원질대사

에 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

CsA에 의한 치은증식에 대한 기존의 연구들은 살펴보면 상피층이 두터워짐과 상피돌기(retic peg)의 침윤성 증식을 특징적으로 보고하고 여러 실험들도 이러한 조직학적 발견들을 기반으로 하여 진행된 것을 알 수 있다^{32,33)}. 이에 비하여 상피층 증 각화층의 두께변화에 대한 연구들은 많지 않은데 본 연구는 이러한 점에 착안하여 상피층 중 특히 각화층을 구성하는 치은각화세포에 초점을 맞추고 시행하였다. CsA가 각화세포의 세포주기를 빠르게 변화시켜 각화층이 증식된다거나 각화세포 자체의 비대(hypertrophy)를 유도하여 직접적으로 치은증식을 일으킨다는 보고³⁴⁾가 있는 반면 정반대로 CsA가 치은각화세포에서 항증식 효과(antiproliferative effect)를 가진다는 보고³⁵⁾도 있다. 결론적으로 이번 실험은 CsA에 의한 치은증식은 상피층 중 각화층의 변화와 관련이 있을 수 있으며, 이는 각화세포에 대한 CsA의 직간접적인 교원질 대사, 특히 성장인자 중 MMP-1 발현증가에 의한 영향으로 발생할 수도 있다는 것을 보여준다. 그리고 치은각화세포에서 CsA에 의한 교원질 대사에 관련된 성장인자와 세포분열의 주기를 조절하는 성장인자들 사이의 관련성에 대한 연구는 추가적으로 진행되어야 할 것으로 사료 된다.

V. 결 론

본 연구는 정상치은조직에서 배양된 구강 치은각화세포에서 CsA에 농도 변화에 의한 MMP-1, TIMP-1, TGF- β 1 mRNA의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. MMP-1과 TGF- β 1은 배양된 치은 각화세포에서 CsA 농도에 따른 발현 변화는 없었지만, TIMP-1은 배양된 치은 각화세포에 CsA 농도 500 ng/ml에서 유의한 증가를 보였다. 결론적으로 CsA에 의한 치은증식이 MMP-1의 교원질 분해를 통한 상피층 또는 결합조직으로의 침윤성 증식보다는 TIMP-1의 상피층 내에서의 교원질 분해억제를 통한 상피층 증식으로 인하여 발생할 수 있다는 가능성을 제시한다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM : Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. Quintessence Int 1999;30:775-83.
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 1999;70:587-93.
3. Tipton DA, Fry HR, Dabbous MK : Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. J Periodontal Res 1994;29:401-9.
4. Brown RS, Beaver WT, Bottomley WK : On the mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. J Oral Pathol Med 1991;20:201-9.
5. Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS : The pathogenesis of drug induced gingival overgrowth. J Clin Periodontol 1996;23:165-75.
6. Seymour RA, Jacobs DJ : Cyclosporin and the gingival tissues. J Clin Periodontol 1992;19:1-11.
7. David-Neto E, Lemos FB, Furusawa EA et al : Impact of cy-

- cyclosporin A pharmacokinetics on the presence on side effects in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001;11:343-9.
8. Starzl TE, Weil R 3rd, Iwatsuki S et al : The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1980;151:17-26.
 9. Ryffel B, Donatsch P, Madorin M et al : Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Arch Toxicol* 1983;53:107-41.
 10. Rateitschak-pluss EM, Hefti A, Lortscher R et al : Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 1983; 10:237-46.
 11. 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* 2000;71:50-7.
 12. Nagase H, Visse R, Murphy G : Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-73.
 13. Maiola MP, McFadyen ML, Connolly C et al : Related Factors influencing phenytoin-induced gingival enlargement. *J Clin Periodontol* 2000;27:506-12.
 14. Naidoo LC, Stephen LX : Nifedipine-induced gingival hyperplasia : non-surgical management of a patients. *Spec Care Dentist* 1999;19:29-34.
 15. Tumini V, Di Placido G, D'Archivio D et al : Hyperplastic gingival lesions in pregnancy. I. Epidemiology pathology and clinical aspects. *Minerva stomatol* 1998;47:159-67.
 16. Weckx LL, Hidal LB, Marcucci G : Oral manifestations of leukemia. *Ear Nose Throat J* 1990;69:341-2.
 17. Stambaugh RV, Morgan AF, Enwonwu CO : Ascorbic acid deficiency associated with dilantin hyperplasia. *J Periodontol* 1973;44:244-7.
 18. Turkmen A, Ak G, Furuncuoglu Y et al : Relationship between gingival hyperplasia and class II histocompatibility antigens in renal transplant recipients. *Nephron* 2000;84:29-31
 19. 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* 2001;72:354-60.
 20. Varga E, Mair LH : Medication influencing the development of gingival overgrowth in renal transplant patients. *Transplant Proc* 1998;30:2120-1.
 21. Kohnle M, Lutkes P, Witzke O et al : Conversion to tacrolimus in cyclosporin A treated patients with gum hyperplasia. *Transplant Proc* 1998; 30:2122-3.
 22. Nash MM, Zaltzman JS : Efficacy of azithromycin in the treatment of cyclosporine-induced gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998;65:1611-5.
 23. 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* 1998;30:2117-9.
 24. Citterio F, Di Pinto A, Borzi MT et al : Azithromycin treatment of gingival hyperplasia in kidney transrecipients is effective and safe. *Transplant Proc* 2001;33:2134-5.
 25. Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT et al : The effects of cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2003;74:437-45.
 26. 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* 2002;73:1273-8.
 27. Kim YJ, Hwang KG, Oh Y et al : The growth factors expression of cyclosporin induced gingival overgrowth. *J Kor Maxillofac Plast Recons Sur* 2005;27:438-43.
 28. 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* 2003;74:1625-33.
 29. 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* 2004;58:231-8.
 30. Yoshida T, Nagata J, Yamane A : Growth factors and proliferation of cultured rat gingival cells in response to cyclosporin A. *J Periodontal Res* 2005;40:11-9.
 31. 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* 2002;73:1313-22.
 32. Kim YM, Hwang KG, JS Lee et al : The mRNA expression of growth factors in fibroblast from gingival hyperplasia induced by cyclosporin A. *J Kor Maxillofac Plast Recons Sur* 2006;28:445-453.
 33. Pisanty S, Rahamim E, Ben-Ezra D et al : Prolonged systemic administration of cyclosporin A affects gingival epithelium. *J Periodontol* 1990;61:138-41.
 34. Pisanty S, Shoshan S, Chajek T et al : The effect of cyclosporin A (CsA) treatment on gingival tissue of patients with Behcet's disease. *J Periodontol* 1988 ;59:599-603.
 35. Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuutila ML : Mast cell subpopulations in gingival overgrowth induced by immunosuppressive and nifedipine medication. *J Periodontol* 2004;75:933-8.
 36. Esposito C, Fornoni A, Cornacchia F et al : Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 2000;58:123-30.