

Cyclosporin A가 *in vitro*에서 조골세포에 미치는 영향

김재우¹ · 이현정² · 강정화² · 옥승호² · 최봉규² · 유윤정² · 조규성¹ · 최성호¹

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소¹

연세대학교 치과대학 구강생물학교실²

I. 서론

Cyclosporin A(CsA)는 장기 이식시 이식거부반응을 방지하기 위해 광범위하게 사용되는 면역억제제이다^{1,2}. CsA는 여러 가지 부작용을 가지는데 그 중 널리 알려진 것이 간독성, 신장독성, 고혈압, 다모증, 위장관장애, 치은 과증식 등이 있다^{3,4}. 이러한 부작용들은 동물실험에서는 잘 나타나지 않고 임상적으로 사용되었을 때 나타나며⁵ 이중에서 치주영역과 연관된 것으로 치은의 과증식과 골 개조에 대한 효과가 보고되고 있다.

치은의 과증식은 CsA를 처음 사용하기 시작한 1980년대 초에 처음 보고되었으며^{5,6} 이를 입증하기 위해 동물실험을 시행한 결과, CsA를 각각 15-45mg/kg, 45-95mg/kg 투여받은 개와 고양이 모두에서 치은 과증식이 관찰되었다⁷. CsA에 의한 치은 과증식은 1983년 처음으로 치과 문헌에 소개된 이후 치은 과증식의 발병률과 심도에 영향을 주는 요소에 대한 검토가 이어지고 있다⁸. 또한 치은 과증식을 규명하기 위하여 Bartold 등(1989)이 시행한 CsA 치은 섬유아세포 배양실험에서는 CsA가 치은 섬유아세포의 증식능 자체를 자극하는 것으로 나타났지만 단백질 합성능력을 촉진하는 경향은 없는 것으로 나타난 바

있다^{9,10}.

최근에는 생체내에 투여된 CsA가 골의 형성과 흡수의 증가 및 감소에 영향을 미쳐서 골 개조에 상당한 영향을 미친다고 보고하고 있는데^{11,12} 초기의 임상실험 관찰은 CsA로 치료한 환자군에서 azathioprin 치료 환자군 보다 혈청 Alkaline phosphatase (ALP) 수준이 상승된 것이 발견되었다. 신장이식과 골이식을 받은 환자에서 CsA투여시 조골세포 파라미터가 증가되고 흡수성 파라미터는 감소되었다^{12,13}. 이러한 발견들은 CsA의 골에 대한 세포활동 기전에 대한 흥미를 일으키고 있지만, 골조직에 대한 효과는 단지 부분적으로만 알려져있다.

CsA는 시험관에서 Parathyroid hormone(PTH), interleukin-1, prostaglandin E₂ 그리고 1,25 dihydroxyvitamin D 등에 의해서 자극된 골의 흡수를 억제한다고 보고되어 왔다^{14,15,16}. CsA의 비면역 억제 유사체가 시험관에서 골흡수 활동을 억제하지 않기 때문에 CsA의 면역억제 특성이 골에 대한 효과와 연관이 있을 것이라고 생각되어져 왔다¹⁷. 더욱이 CsA는 파골세포분화 조절인자인 tumor necrosis factor- α 와 β 그리고 interferon- γ ¹⁸의 생성을 억제한다고 알려졌으며 일부 연구에서는 CsA의 골흡수 억제는 파골세포 전구세포 융합의 감소에 의해 야기되는 것으로

*이 연구는 1999년도 연세대학교 치과대학의 연구비 지원에 의한 결과임.

교신저자: 최성호 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 치주과학교실 우편번호 120-752

보고하였다¹⁹⁾. 또한 생체내실험에서도 CsA가 골 형성과 흡수를 증가시키는 것이 관찰되었고 그 증가는 최종적으로는 골 부피의 감소와 연관이 있었다²¹⁻²⁴⁾. 이러한 CsA에 의한 파골세포 분화 억제에는 파골세포의 성장과 기능^{14,17,19)} 그리고 조골세포의 증식과 단백질 합성 능력에^{25,26)} 영향을 미친다고 하였다. 한편 상반된 결과로서 Orsel 등¹²⁾은 쥐에서 CsA에 의한 골 형성의 증가와 골 흡수의 억제를 관찰하였다.

대부분의 골흡수를 유발하는 약물은 조골세포에 결합하거나 그 기능을 변화시키고 파골세포의 기능 자체는 직접 변경시키지는 않는 것으로 알려져 왔다²⁷⁾. 위에서 언급한 바와 같이 CsA의 파골세포 분화에 대한 효과는 많이 연구되어왔고 그 효과 및 기전이 어느 정도 밝혀졌지만 CsA의 조골세포에 대한 특성은 잘 알려져 있지 않았다. 골에 대한 CsA의 작용기전을 잘 이해하는 것이 골 개조의 기본적인 특성, 대사성 골 질환에서의 약물치료 개입여부, 골 생리에 있어서의 면역억제에 의한 결과 등에 대한 정보를 제공할 것이라 사료되었다.

이에 본 연구는 시험관내에서 CsA가 조골세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 CsA가 마우스 두개골세포의 증식, 교원질 및 ALP 합성에 미치는 영향을 관찰하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 마우스 두개골 세포 배양

마우스 두개골 세포는 생후 1일된 ICR 마우스에서 분리하여 사용하였으며 전구조골세포주인 MC3T3세포를 사용하였다. 세포배양에 사용된 Alpha Minimum Essential Medium(α -MEM)과 Antibiotic antimycotic 용액, Fetal Bovine Serum(FBS)은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였으며, ascorbic acid(AA), β -glycerophosphate, CsA, ALP kit(ALP-10)는 Sigma(USA)에서 구입하였다. 두개골 세포를 분리하기 위하여 사용하는 효소인 collagenase와 dispase는 Wako(Japan)에서 구입하였으며, Sircol collagen

assay kit는 Biocolor Ltd.(USA/Canada)에서 구입하여 사용하였다.

(2) CsA 준비

CsA는 불용성이기 때문에 실험에 들어가기 앞서 상품화된 CsA 1mg을 100 μ l ethanol에 녹이고 10 μ l Tween 20을 첨가하였다. 마지막으로 배양배지인 α -MEM을 890 μ l 첨가하여 10⁻⁶ g/ml의 농도를 만들었다.

2. 실험방법

(1) 마우스 두개골 세포의 분리

생후 1 일된 ICR 마우스 10마리를 에탄올 용액에 담가 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하여, 10 ml의 효소용액(0.2% collagenase 및 0.1% dispase가 함유된 α -MEM배지)에 부유시킨 후 37℃에서 10분간 교반한 후 상층액을 버렸다. 다시 10 ml의 효소용액을 넣고 37℃에서 20분간 교반하여 상층액을 모았다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 상층액을 2000×g에서 5분간 원심분리하여 마우스 두개골 세포를 얻었다.

(2) 세포증식능 측정

세포증식능은 MTT 방법으로 측정하였다. 96 well 배양기에 마우스 두개골 세포와 MC3T3세포를 각각 well당 1×10⁵개씩 분주한 뒤 배양하였다. 2일 후 배지를 제거하고 CsA가 각각 0.5, 1, 3 μ g/ml로 함유된 배양배지로 교환하고 2일 후 각각의 well에 50 μ l의 MTT(5mg/ml)용액을 첨가하고 37℃에서 4시간동안 반응시켰다. 그 후, 반응액을 제거하고, 200 μ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣고 세포 안에 형성된 formazan결정을 녹인 뒤 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 교원질 합성능 측정

마우스 두개골세포에 의한 교원질 합성은 Sircol collagen assay kits를 사용하여 측정하였다. 24 well 배양기에 단일밀생층을 형성하도록 배양한 마우스 두개골 세포에 0.5, 1 또는 3 μ g/ml 농도의 CsA가 함유

배배지를 첨가하여 10일간 배양하였다. 배양상층액 100 μ l에 1ml의 sircol dye 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 반응시킨 후 5000 xg에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전된 Sircol dye와 결합된 교원질을 알칼리용액 1ml에 녹인 후 530nm에서 흡광도를 측정했다. 같은 방법으로 측정된 type I 교원질 표준곡선을 이용하여 합성된 교원질 양을 계산하였다.

(4) Alkaline phosphatase 활성측정

24 well 배양기에서 단일밀생층이 형성될 때까지 마우스 두개골 세포를 배양한 다음, ascorbic acid(50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate(10 mM) 그리고 CsA가 농도별로 함유된 배지와 교환하였다. 3일에 한번씩 새 배지로 교환하면서 10일간 배양하였다. 배양배지를 제거한 후 각 well당 효소용액(0.2% collagenase, 0.1% dispase) 100 μ l를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 다음, 세포를 1.5ml tube에 옮긴 후 흔들어서 세포간 교원질을 분리시켰다. 원심분리하여 상층액을 버리고 세포만을 모은 후 PBS로 2번 세척했다. 분리한 세포를 얼음에 옮긴 후 100 μ l의 0.1% triton X-100(Sigma, USA)용액을 첨가하여 30분간 방치하였다. 5000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 ALP 활성을 측정에 사용하였다. 20 μ l의 세포액을 1 ml의 ALP-10(Sigma, USA)용액과 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서 30초 및 2분간 반응시킨 후 생성되는 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도로 측정하였다.

(5) mRNA 분리 및 Northern blot

CsA로 처리한 마우스두개골세포로부터 Trizol 용액(GIBCO BRL, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 20 μ g를 formaldehyde를 함유한 1% agarose gel상에서 전기영동한 후 Nylon plus membrane에 전이시킨 후 ultraviolet radiation으로 RNA를 고정시켰다. RNA가 부착된 막을 tube에 넣고 hybridization buffer(0.1mg/ml의 salmon sperm DNA가 함유된 50% formamide/5x Denhardt's 용액/5xSSC/0.5% SDS 용액)를 가하고 42 $^{\circ}$ C가 유지되는 hybrid minihybridization oven에서 30분간 prehy-

brid를 실시하였다. 그 후 동위원소로 표지화된 ALP 유전자 표식자를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 15시간 hybridization을 실시하였다. RNA 표식자는 아래와 같은 cDNA를 이용하여 [32 P]dCTP(3,000 Ci/mmol, Dupont NEN Research Products, Boston, MA, USA)로 표지화 하였으며 random primed DNA labeling kit(GIBCO BRL, USA)를 이용하여 합성하였다. 2.4kb의 rat ALP cDNA insert, Nylon membrane을 세척액으로 세척하고 이를 -70 $^{\circ}$ C에서 Kodak X-OMAT film에 감광시킨 후 현상하였다. 전기영동한 RNA의 농도는 28S rRNA의 농도를 기준으로 분석하였다.

(6) 통계분석

모든 자료는 Nonparametric Test인 Mann-Whitney Test를 이용하여 분석한다.

III. 실험성적

1. 마우스 두개골세포 및 MC3T3 세포 증식능

CsA에 의한 조골세포 증식능을 확인하기 위해 마우스 두개골세포에 CsA를 각각 0.5, 1, 3 μ g/ml 농도로 처리하였다. 2일이 경과한 후에 MTT방법을 이용하

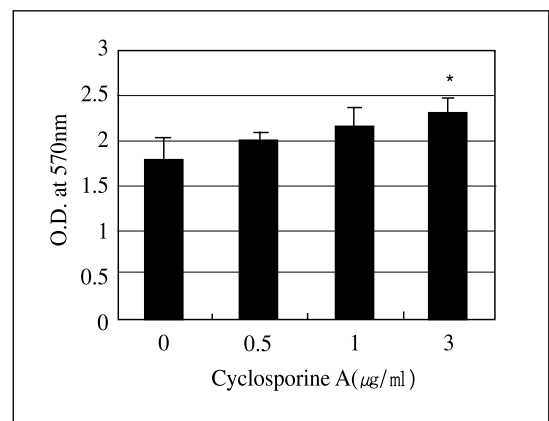


Figure 1. Effect of CsA on proliferation of mouse Calvarial cell.

Values represents the mean \pm S.D. from 3 independent experiments.

*: Significantly different from the non treated group, $P < 0.05$

Table 1. Effect of CsA on proliferation of mouse Calvarial cell

CsA con. ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,5	1	3
O.D.	$1,8 \pm 0,25$	$2 \pm 0,09$	$2,16 \pm 0,21$	$2,31 \pm 0,15^*$

Values are mean \pm S.D., n=3

*Significantly different from the non treated group, $P < 0,05$

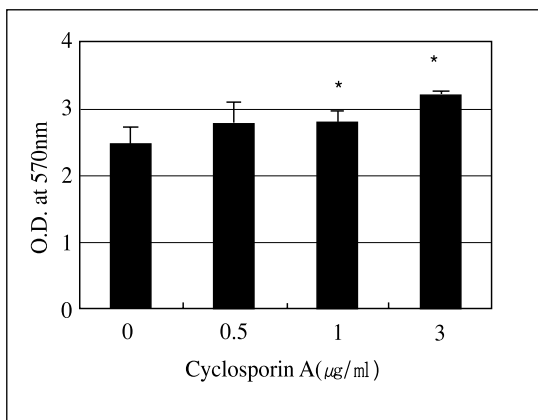


Figure 2. Effect of CsA on proliferation of MC3T3 cell.

Values represents the mean \pm S.D. from 6 independent experiments.

: * Significantly different from the non treated group, $P < 0,05$

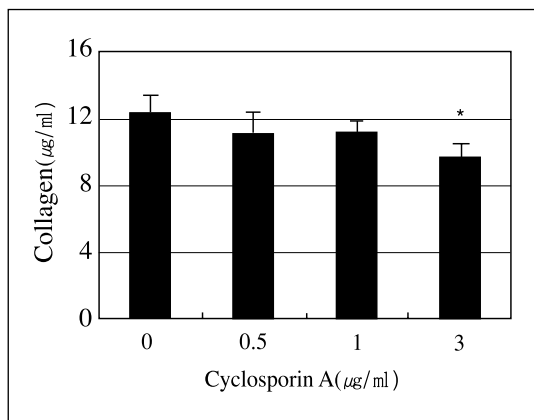


Figure 3. Effect of CsA on Collagen synthesis of mouse Calvarial cell.

Values represents the mean \pm S.D. from 3 independent experiments.

: * Significantly different from the non treated group, $P < 0,05$

Table 2. Effect of CsA on proliferation of MC3T3 cell

CsA con. ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,5	1	3
O.D.	$2,45 \pm 0,25$	$2,77 \pm 0,30$	$2,78 \pm 0,18^*$	$3,20 \pm 0,05^*$

Values are mean \pm S.D., n=6

*Significantly different from the non treated group, $P < 0,05$

Table 3. Effect of CsA on Collagen synthesis of mouse Calvarial cell

CsA con. ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,5	1	3
Collagen ($\mu\text{g/ml}$)	$12,70 \pm 2,13$	$11,19 \pm 2,03$	$10,88 \pm 0,96$	$9,88 \pm 1,18^*$

Values are mean \pm S.D., n=3

*Significantly different from the non treated group, $P < 0,05$

여 증식능을 확인한 결과 $3\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포의 수가 증가하였다(Figure 1, Table1).

또한 CsA를 전구조골세포주인 MC3T3 세포에 농도별로 처리하여 농도에 따른 세포의 증식능 변화를

살펴보았다(Figure 2, Table 2). CsA를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, CsA 농도 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포수가 증가하였다.

2. 교원질 합성능

CsA가 조골세포의 교원질 합성능에 미치는 영향을 살펴보았다(Figure 3, Table 3). CsA를 처리하지 않은 대조군과, CsA를 0.5, 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 실험군의 교원질 합성량을 비교했을 때 교원질 합성능은 CsA 농도 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 감소하였다.

3. ALP 활성

CsA에 의한 골형성능을 확인하기 위해 조골세포를 CsA가 농도별로 함유된 배지에서 10일간 배양한 후 세포막을 파괴시켜 세포내 ALP의 양을 측정하였다(Figure 4, Table 4).

대조군과 비교하여 CsA는 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 ALP 활성을 증가시켰다.

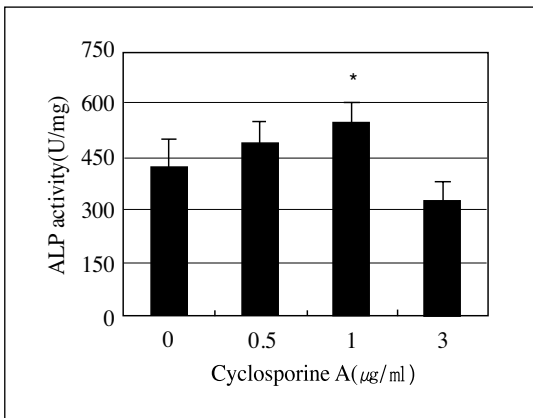


Figure 4. Effect of CsA on ALP activity of mouse Calvarial cell.

Values represents the mean \pm S.D. from 5 independent experiments.

: * Significantly different from the non treated group, $P < 0.05$

Table 4. Effect of CsA on ALP activity of mouse Calvarial cell

CsA con. ($\mu\text{g/ml}$)	0	0.5	1	3
ALP activity (U/mg)	417.10 \pm 80.74	486.10 \pm 61.14	547.29 \pm 61.46*	327.46 \pm 56.38

Values are mean \pm S.D., n=5

*Significantly different from the non treated group, $P < 0.05$

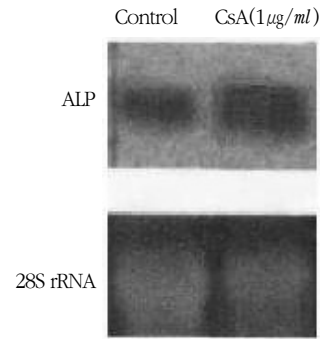


Figure 5. Expression of ALP mRNA of CsA treated mouse Calvarial cell.

Expression of ALP mRNA was analyzed by Northern blot analysis as described in material and methods.

4. ALP mRNA 발현

CsA에 의한 조골세포의 골 형성능을 재확인하기 위해 마우스 두개골 세포를 CsA가 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 함유된 배지에서 배양한 후 RNA를 분리하여 조골세포 분화표지인자, 즉 ALP의 발현정도를 대조군과 비교하여 분석하였다(Figure 5).

대조군에서는 ALP가 약하게 발현된 반면 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CsA를 처리한 경우 ALP mRNA 발현이 대조군에 비하여 증가하였다.

IV. 총괄 및 고찰

CsA는 장기이식시 조직의 거부반응을 방지하기 위해 광범위하게 사용되는 면역억제제^{1,4)}로서 특히 치은 과증식 때문에 치주과 영역에 잘 알려지게 된 약물이다. 이 약물이 널리 사용되고 있음에도 아직까지 골조직에 대한 효과가 단지 부분적으로만 알려

졌다. 전구조골세포는 일련의 과정, 즉, 증식기, 골단 백질합성시기 및 석회화시기를 거쳐 성숙된 조골세포로 분화하며 골 기질 단백 중 교원질 및 ALP는 초기에 발현이 된다. 이에 본 실험은 시험관에서 CsA가 조골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CsA가 마우스 두개골세포의 증식, 교원질 합성 및 ALP 발현에 미치는 영향을 CsA 0.5, 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 관찰하였다.

MTT test 결과 CsA는 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 마우스 두개골세포의 세포수를 증가시켰다. 분리한 마우스 두개골 세포에는 조골세포뿐만 아니라 섬유아세포도 함유되어 있을 가능성이 있으며 또한 Boran 등 (1996)의 치은 섬유아세포 배양실험에서는 CsA가 치은 섬유아세포의 증식을 자극하는 것으로 나타나^{9,10)} 전구조골세포주인 MC3T3에서 CsA에 의한 세포증식능을 평가하여 CsA에 의한 마우스두개골세포의 증식 촉진이 조골세포의 반응인지 재 확인하였다. 실험 결과, CsA 3 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성있게 세포수가 증가하였다. 이러한 결과로 비추어 볼 때, CsA가 조골세포의 증식을 촉진시켰을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구결과와는 상반된 연구결과로서 Laurie 등 (1992)²⁸⁾ 및 Takaaki(1998)²⁹⁾ 등은 쥐의 Osteosarcoma로부터 분리한 유사조골세포인 ROS 17/2.8 cell(Rat Osteoblast-like Osteosarcoma Cell)에서 CsA에 의한 세포 증식능을 평가하였으며 Laurie 등은 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서, Takaaki등은 1 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 CsA가 세포의 증식능을 억제하는 것으로 보고하였다. 이러한 차이는 실험에 사용된 CsA의 농도 및 실험대상 세포의 성숙도의 차이에 기인한 것으로 생각해 볼 수 있다.

CsA의 마우스 두개골 세포들에 대한 교원질 생성능에 대한 실험에서는 CsA 농도 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 교원질 합성량이 감소하였다. 이는 성숙된 조골세포인 ROS cell에서 type I α collagen mRNA가 감소하였다는 이전의 연구결과와 일치하는데, 이와 같은 결과들은 CsA가 조골세포의 교원질합성을 억제할 수 있음을 시사한다²⁸⁾. 한편, Schincaglia GP(1992) 등이 CsA가 치은섬유아세포에서 α -procollagen 합성을 3배까지 증가시켰다³¹⁾고 보고한 것을 볼 때 CsA에 의한 교원

질합성의 변화는 세포의 종류에 따라 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

CsA에 의한 ALP의 활성도 변화에 대한 이전의 연구들로는 본 연구에서 사용한 세포와는 다른 ROS 세포에서 관찰한 연구와 CsA 투여 후 생체내에서 ALP의 농도 변화를 측정된 것이 있다. 이들 연구결과들에 의하면 ROS 세포에서는 CSA가 1-10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 1- 2일 후 세포의 ALP의 발현을 억제시켰으며^{28,29)} 이와는 반대되는 결과로서 생체내에서는 CsA 투여시 ALP의 농도가 증가하였다¹²⁾.

본 연구에서는 마우스 두개골 세포를 CsA로 10일간 처리하여 ALP 발현을 관찰하였으며 그 결과 CsA 농도 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 ALP의 발현이 증가하였고 3 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 유의성은 없었지만 ALP 활성도가 감소하는 경향을 보였다. 그리고, CsA에 의한 조골세포의 ALP 발현촉진을 재확인하기 위해 CsA로 처리된 마우스 두개골 세포로부터 RNA를 분리하여 ALP mRNA의 발현정도를 대조군과 비교하여 분석하였다. 이 때, 대조군에서는 ALP가 약하게 발현된 반면, CsA(1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 경우 ALP mRNA 발현이 대조군에 비하여 증가하였다. 이전의 연구에서는 24-48 시간 자극 후 CsA가 ALP의 발현을 억제하였다고 보고하였는데 본 연구에서는 10일간 자극하여 ALP의 발현을 관찰하였다. ALP는 조골세포의 분화 초기에 발현되는 분화표식인자이므로 이러한 결과는 CsA가 조골세포의 ALP의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 줄 가능성을 제시한다.

본 연구에서 CsA는 마우스 두개골 세포의 증식 및 ALP의 발현을 증가시켰으며, 교원질의 합성은 억제하였다. 이러한 일련의 CsA의 마우스 두개골세포에 대한 효과는 CsA를 처리한 인체와 실험동물에서 관찰된 골 개조과정의 변화에 있어서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

이전의 연구들에서는 주로 Osteosarcoma에서 분리된 조골세포유사세포에서 측정하였고 본 연구에서는 CsA의 조골세포에 대한 작용을 마우스 두개골 세포에서 분리한 세포에서 측정하였다. 이들 연구결과들과 비교하여 교원질 합성능 억제효과는 동일하게 나왔으나 증식능 및 ALP 발현에 있어서는 서로

상반된 결과를 얻었다. 이러한 결과의 차이가 CsA의 농도, 자극시간 또는 세포의 특성의 차이에 의한 것인지를 알아보기 위해서는 추후 농도와 배양세포 등의 조건을 맞추어서 재확인하는 과정이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

CsA가 조골세포에 미치는 영향을 평가하고자 CsA가 마우스두개골세포의 증식, 교원질 및 ALP발현에 미치는 영향을 측정하였다. 세포의 증식능은 MTT방법, 교원질합성능은 Sircol 교원질 측정법 그리고 ALP 발현은 발색반응 및 Northern blot 방법으로 확인하였다.

1. CsA는 $3\mu\text{g/ml}$ 농도에서 마우스 두개골세포의 세포증식능을 증가시켰다.
2. CsA는 1 및 $3\mu\text{g/ml}$ 농도에서 전구조골세포주인 MC3T3세포의 증식능을 증가시켰다.
3. CsA는 $3\mu\text{g/ml}$ 농도에서 마우스 두개골세포의 교원질 합성을 억제하였다.
4. CsA는 $1\mu\text{g/ml}$ 농도에서 마우스 두개골세포의 ALP 합성 및 mRNA의 발현을 증가시켰다.

이러한 결과들은 CsA가 조골세포의 증식 및 분화에 영향을 미쳐 CsA에 의한 골개조에 관여할 가능성을 제시한다.

VI. 참고문헌

1. Foxwell, BMJ., Ruffel, B. : The mechanisms of action of cyclosporine, Immunol Allergy Clin North Am, 9:79-93, 1989
2. Kahan, BD : Cyclosporine Vol 1. Biological activity and clinical applications, Harcourt Brace Jovanovich, New York, p241
3. Seymour, R.A, Jacobs, D.J. : Cyclosporin and the gingival tissues, J Clin Periodontol, 19:1-11, 1992
4. 문현주, 김창성, 서종진, 박지숙, 윤정훈, 조규성, 최성호 : Cyclosporin A에 의한 치은 과증식의 형

태학적 특성, 대한치주과학회지, 30(3):609-618, 2000

5. Calne, R.Y., Rolles, K., White, D.J.G., Thiru, s., Evans, D.B., Henderson, R., Hamilton, D.L., Boone, N., McMaster P., Gibby, O., Williams, R. : Cyclosporin-A in clinical organ grafting, Transplantation Proceedings, 13:349-358, 1981
6. Starzl, T.E., Weil, R., Iwatsuki, S., Klintmalm, G., Schroter, G.P.J., Koep, L.J., iwaki, Y., Terasaki, P.I., Porter, K.A. : The use of cyclosporin A and prednisone in cadevar kidney transplantation, Sur Gyn Obs, 151:17-26, 1980
7. Ryffel, B., Donatsh, P., Mandorin, M. : Toxicological evaluation of cyclosporin A, Arc Tox, 53:107-141, 1983
8. Schuller, P.D., Freedman, H.L., Lewis, D.W. : Periodontal status of renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy, J Periodontol, 44:167-170, 1973
9. Bartold, PM. : Regulation of human gingival fibroblasts growth and synthetic activity by cyclosporin-A *in vitro*, J Periodont Res, 24:314-321, 1989
10. Boran, M., Gunes, Z., Doruk, F., Gonenc, F., Cetin, S. : Improvement in cyclosporine A associated gingival hyperplasia with azithromycin therapy, Trasplantation Proceedings, 28(4):2316, 1996
11. Movsowitz, C., Epstein, S., Fallon, M., Ismail, F., Thomas, S. : Cyclosporin A in the oophorectomized rat: unexpected severe bone resorption, J Bone Miner Res, 4:387-391, 1989
12. Orcel, P., Bielakoff, J., Modrowski, D., Miravet, L., de Vernejoul, MC. : Cyclosporin-A induces *in vivo* inhibition of resorption and stimulation of formation in rat bone, J Bone Miner Res, 4:387-391, 1989
13. Wilmlink, JM., Bras, J., Surachno, S., vHeyst, JLAM., vdHorst, JM. : Bone repair in

- cyclosporin-treated renal transplant patients, *Transplant Proc*, 21:1492-1494, 1989
14. Chowdhury, MH., Shen, V., Dempster, W. : Effects of Cyclosporin-A on chick osteoclasts *in vitro* : *Calcif Tissue Int*, 49:275-279, 1991
 15. Klaushofer, K., Hoffman, O., Stewart, PJ., Czerwenka, E., Koller, K., Peterlik, M., Stern, PH. : Cyclosporine A inhibits bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria, *J Pharmacol Exp Ther*, 243:584-590, 1987
 16. McCauley, LK., Rosol, TJ., Stromberg, PC., Capen, CC. : Effects of interleukin-1 alpha and cyclosporin A *in vivo* and *in vitro* on bone and lymphoid tissues in mice, *Toxicol Pathol*, 19:1-10, 1991
 17. Stewart, PJ., Stern, PH. : Cyclosporines: correlation of immunosuppressive activity and inhibition of bone resorption, *Calcif Tissue Int*, 45:222-226, 1989
 18. Espevik, T., Figari, IS., Shalaby, MR., Lackides, GA., Lewis, GD., Shepard, HM., Palladino, MA. : Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta, *J Exp Med*, 166:571-576, 1987
 19. Orcel, P., Denne, MA., de Vernejoul, MC. : Cyclosporin-A *in vitro* decreases bone resorption, osteoclast formation, and the fusion of cells of the monocyte macrophage lineage, *Endocrinology*, 128:1638-1646, 1991
 20. Aubia, J., Masramon, J., Serrano, S., Lloveras, Marinoso, LI. : Bone histology in renal transplant patients receiving cyclosporin, *The Lancet*, 1:1048-1049, 1988
 21. Movsowitz, C., Epstein, S., Fallon, M., Ismail, F., Thomas, S. : Cyclosporin-A *in vivo* produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration, *Endocrinology*, 123:2571-2577, 1988
 22. Schlosberg, M., Movsowitz, C., Epstein, S., Ismail, F., Fallon, MD., Thomas, S. : The effect of Cyclosporin A administration and its withdrawal on bone mineral metabolism in the rat, *Endocrinology*, 124:2179-2184, 1989.
 23. Stein, B., Takizawa, M., Katz, I., Joffe, I., Berlin, J., Fallon, M., Epstein, S. : Salmon calcitonin prevents Cyclosporin-A-induced high turnover bone loss, 129:92-98, 1991
 24. Katz, I., Jee, WSS., Joffe, II., Stein, B., Takizawa, M., Jacobs, TW., Setterberg, R., Lin, BY., Tang, LY., Ke, HZ., Zeng, QQ., Berlin, J., Epstein, SJ. : Prostaglandin E₂ alleviates Cyclosporin-A-induced bone loss in the rat, *Bone Miner Res*, 7:1191-1200, 1992
 25. McCauley, L., Rosol, T., Capen, C. : Effects of Cyclosporin-A on rat osteoblasts(ROS 17/2.8 cells) *in vitro*, *Calcif Tissue Int*, 51:291-297, 1992
 26. Sinai-Treiman, L., Iida-Klein, A., Salusky, IB., Hahn, TJ. : Cyclosporin-A inhibits -A and protein synthesis and alters second messenger generation in osteoblast-like cells, Meeting American Society of Bone Mineral Research, S:336, 1989
 27. Vaes, G. : Cellular biology and biochemical mechanisms of bone resorption, *Clin Orthop Rel Res*, 231:239-271, 1988
 28. Laurie, K., McCauley, thomas, J., Rosol, Charles C. Capen : Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts(ROS 17/2.8cells) *in vitro*, *Calcif Tissue Int*, 51:291-297, 1992
 29. Takaaki Ogawa, Masaaki Tokuda, Kazuhito Tomizawa, Hideki Matsui, Toshifumi Itano : Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 249:226-230, 1998
 30. Hassel, T., Buchanann, J., Cuchens, M., Douglas, R. : Fluorescence activated vital cell sorting of human fibroblast subpopulations that bind cyclosporine-A, *J Dent Res*, 67:2773, 1988

31. Schincaglia, G.P., Forniti, F., Cavallini, R., Piva, R., Calura, G., del Senno, L. : Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblast *in vitro*, J Oral Pathol Med, 21:181-185, 1992
32. Li, XQ., Stevenson, S. Slein, L., Davy, DT., Shaffer, JW., Goldberg, VM. : Differential patterns of incorporation and remodeling among various types of bone grafts, Acta Anat, 140:236-244, 1991
33. Deliliers, G.L., Santoro, F., Polli, N., Bruno, E. Fumagalli, L., Risciotti, E. : Light and Electron Microscopic Study of Cyclosporin A-induced gingival hyperplasia, J Periodontol, 57:771-775, 1986
34. B.Y. Klein, I. Gal, R. Mosheiff, M. Liebergall, H. Ben-Bassat : Cyclosporin A and its non-immunosuppressive derivative exhibit a differential effect on cell-mediated mineralization in culture, J of Cellular Biochemistry, 64:209-216, 1997

The Effect of Cyclosporin A on Osteoblast in vitro

Jae-Woo Kim¹, Hyun-Jung Lee², Jung-hwa Kang², Seung-Ho Ohk², Bong-Kyu Choi²

Yun Jung Yoo², Kyoo-Sung Cho¹, Seong-Ho Choi¹

Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration¹ and Oral Biology²,
College of Dentistry, Yonsei University

Cyclosporin A(CsA) is an immunosuppressive agent widely used for preventing graft rejecting response in organ transplantation. The basic properties of CsA to osteoblast has not been well known yet. A better understanding of the mechanisms of CsA function on bone could provide valuable information regarding basic properties of bone remodeling, pharmacotherapeutic intervention in metabolic bone disease, and the consequences of immunosuppression in bone physiology.

The purpose of this study was to investigate the effect of CsA on osteoblast by evaluating parameters of proliferation, collagen synthetic activity, alkaline phosphatase activity, and ALP mRNA expression in mouse calvarial cell.

1. CsA($3\mu\text{g}/\text{ml}$) treated mouse calvarial cell showed statistically significant increase in cell proliferation, ($P < 0.05$)
2. CsA($1, 3\mu\text{g}/\text{ml}$) treated MC3T3 cell line showed statistically significant increase in cell proliferation.
3. The amount of collagen of CsA($3\mu\text{g}/\text{ml}$) treated mouse calvarial cell was decreased statistically significantly.
4. Alkaline phosphatase activity was increased statistically significantly in CsA treated group($1\mu\text{g}/\text{ml}$).
5. mRNA expression of ALP was increased in CsA treated group

These results suggest that CsA could affect bone remodeling by modulating proliferation & differentiation of osteoblast.

Key word; Cyclosporin A(CsA), Mouse Calvarial Cell, Osteoblast, Collagen Synthesis, Alkaline Phosphatase, Proliferation