

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

離胺基氧化酶與環孢靈誘發牙齦增生關係之探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-034-
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：中山醫學大學口腔醫學研究所

計畫主持人：張育超

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：劉秀瑜

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中華民國 97年09月11日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

離胺基氧化酶與環孢靈誘發牙齦增生關係之探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC -96- 2314-B-040-034

執行期間： 96年 8 月 1 日至 97年 7 月 31 日

計畫主持人：張育超

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：

中 華 民 國 97 年 9 月 11 日

英文摘要

Keywords : Cyclosporin 、Gingival overgrowth 、Lysyl oxidase

Cyclosporin A (CsA) is used as an immunosuppressive agent and its prominent side effect is the induction of fibrous gingival overgrowth. The progression of fibrous gingival overgrowth results from the accumulation of extracellular matrix (ECM). Lysyl oxidase was found to be involved with some fibrotic diseases. However, the correlation between lysyl oxidase and CsA-induced gingival overgrowth was little known. The lysyl oxidase staining in gingival tissue was stronger in CsA-induced gingival overgrowth group than normal gingival group ($p < 0.05$). Intensive staining for lysyl oxidase expression was observed mainly in the cytoplasm of fibroblasts, epithelial cells, and inflammatory cells. CsA was found to increase cystatin C expression in HGFs in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). The increased ability of protein accumulation by lysyl oxidase is one of the several factors developing the CsA-induced gingival overgrowth.

中文摘要

關鍵詞：環孢靈；牙齦增生；離胺基氧化酶

環孢靈(cyclosporin A, 簡稱 CsA)是臨床上被廣泛使用的免疫抑制劑，它的副作用很多，其中與牙科相關的是：使用 CsA 的病人中，大約百分之三十會有牙齦增生的問題，並且容易因牙齦增生而出現牙周炎現象。根據過去的研究，我們知道環孢靈誘發牙齦增生肇因於細胞外基質分解系統的低落，使得結締組織的 ECM 產生增生的現象；離胺基氧化酶也被證實和一些纖維化疾病有關。由文獻回顧可知，鮮少有研究提及離胺基氧化酶與 CsA 誘發牙齦增生的關係。本研究以免疫組織化學染色法發現 lysyl oxidase 在正常牙齦與 CsA 誘發牙齦增生組織間的差異性，lysyl oxidase 在正常牙齦與 CsA 誘發牙齦增生組織有較強烈的表達。以組織培養法，培養人類正常牙齦造纖維母細胞加入 CsA 發現 lysyl oxidase 蛋白表達會增加，所以 CsA 透過 lysyl oxidase 蛋白表達誘發牙齦增生。

背景及目的

CsA 是一種臨床上應用相當廣泛的藥物，最主要的功能是使用在器官移植的病人身上，用來降低因移植所產生的排斥現象。CsA 的副作用很多，最常見且嚴重的副作用是腎毒性(nephrotoxicity)(Jensen et al., 1987)，其他的副作用還有：肝毒性(Kahan et al., 1987)、神經毒性(Atkinson et al., 1984)、高血壓 (Bellet et al., 1985)、高血鉀(Greenberg et al., 1987)、低血鎂(Barton et al., 1987)、淋巴增生 (Harris et al., 1987)、多毛(Palestine et al., 1984)等。其中和牙科相關的就是大約 30%~40%的病人會有牙齦增生現象。

在 CsA-GO 病理組織切片中，可見上皮出現上皮釘(rete peg)深入其下的結締組織，並且上皮有增厚、棘皮肥厚(acanthosis)及副角化(parakeratosis)現象出現；另一方面，組織學上的變化主要來自於結締組織的變厚，在結締組織中，可以發現細胞外基質(extracellular matrix, 簡稱 ECM)的增多，特別是膠原蛋白(collagen)的過量沈積，並且出現了血管增多和發炎細胞的浸潤，其中，發炎細胞以漿細胞(plasma cell)為主。由於 CsA-GO 在組織學上的變化主要是在結締組織，隨著結締組織的增厚，可以發現 ECM 產生增多的現象，而牙齦造纖維母細胞(gingival fibroblasts; 簡稱 GF)扮演著影響細胞間質代謝的主要角色。因此，根據組織學上的變化，過去的學者們推測，CsA 引發之牙齦增生可能肇因於 ECM 的合成與分解失去平衡。

lysyl oxidase 與許多纖維化也有密切的相關性。例如; Goto 等人發現由 Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1)所引起的慢性腎纖維化過程中，lysyl oxidase 有明顯的上升(Goto et al., 2005)。而在由 adriamycin 所引起的腎病變過程中，lysyl oxidase 與 collagen 的

交互作用扮演著很重要的角色(Di *et al.*, 1997) ,除了與腎臟相關的纖維化過程中, lysyl oxidase 在肺臟的纖維化及肝臟的纖維化也有許多文獻探討。Streichenberger 等人 (2001) 發現在支氣管纖維化過程中, lysyl oxidase 會有大量的表現。而在由 bleomycin 所引起的肺損傷過程中, lysyl oxidase 也有大量的表現 (Ledwozyw 1995; Blaisdell & Giri 1995) ,而關於肝臟的纖維化過程中, Kagan (1999) 首先發現 lysyl oxidase 參與在其中, 而 Kim 等人(1999) 更發現肝臟的纖維化是由於 lysyl oxidase 與 type III procollagen 的高度交互作用。Ma 等人 (1995) 發現在台灣因嚼食檳榔所引起的口腔黏膜下纖維化, 其纖維母細胞的 lysyl oxidase 的活性會有明顯的增加, 而 Trivedy 等人(1999) 也發現除了口腔黏膜下纖維化之外, 鱗狀口腔癌的 lysyl oxidase 活性也有上升, lysyl oxidase 的活性上升與銅離子的濃度有密切的關係 (Trivedy *et al.*, 2000)。

CsA 誘發牙齦增生的分子致病機轉迄今仍有待厘清, 至今亦無任何文獻探討 lysyl oxidase 在 CsA 誘發牙齦增生組織上的表達, 及其調控的機轉, 本研究探討 lysyl oxidase 在正常牙齦與 CsA 誘發牙齦增生組織間的差異性。

方法

牙齦組織塊的收集

病人無任何的系統性疾病, 也未曾服用過 Cyclosporin A, 牙周狀況健康, 經由拔牙而取下的組織塊, 共 10 塊, 標記為正常牙齦。病人因服用 CsA 而造成牙齦腫大, 牙周有發炎現象, 經由牙齦切除術而取下的組織塊, 共 15 塊, 標記為腫大牙齦, 以上組織塊皆來自於中山醫學大學附設醫院牙科部牙周病科。手術取下之組織塊後, 以 normal saline 沖洗數次後, 馬上放置於 formaldehyde 中固定, 將用於組織切片的製備。

免疫組織化學染色

福馬林固定之石臘包埋標本, 用切片機切成 5 μm 厚, 將標本貼附在膠質覆蓋之玻片上, 依 streptavidin-biotin system for immunohistological staining 法, 先將切片脫蠟及復水, 加入 methanolic- H_2O_2 solution 阻斷組織本身之內生性過氧化氫酵素, 再加入 serum blocking solution 阻斷組織內非特異性抗原, 滴加抗 lysyl oxidase 等相關因子之一級抗體作用, 滴加 biotinylated goat antimouse secondary antibody 與一級抗體結合, 加入 streptavidin-peroxidase conjugate 與次級抗體結合, 以 DAB 呈色, 最後以去離子水洗淨、封片, 置於光學顯微鏡下觀察, 紀錄分析比較 lysyl oxidase 在人類正常牙齦及病人因服用 CsA 而造成牙齦腫大組織病理的分佈情形。

細胞培養

本實驗培養各 3 株人類正常牙齦纖維母細胞, 皆來自於中山醫學大學附設醫院牙科部牙周病科, 病人皆無系統性疾病, 也未曾服用過 CsA。將牙齦組織取下後, 先用 normal saline 沖洗數次, 再放置於含有 10% fetal bovine serum 及 1% 抗生素的 Dulbecco's modified eagle medium 中; 在無菌操作臺操作, 將牙齦組織切碎於直徑 6 cm 培養皿中, 存放於含 5% 二氧化碳, 95% 空氣, 37°C 的培養箱中, 十四天後後如 fig.1 所示。待細胞長滿培養皿後, 利用 0.25% Trypsin-0.05% EDTA 作用 5 分鐘, 使細胞自培養皿上游離下來, 再加入 medium 進行繼代培養。實驗所採用的牙齦纖維母細胞皆為繼代培養中的 3-8 代。

Western blotting

製備 12.5 % SDS-PAGE 電泳膠片, 置於電泳槽中, 並加入電泳緩衝液。取 16 μl sample, 加入 4 μl loading buffer, 將 sample denature 之後再 loading 到電泳片中, 以 140 伏特進行電泳分離。大約 3 小時之後, 將膠拆下後進行蛋白轉移, 將膠體置入冰冷之 transfer buffer, 將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 Transfer Holder, 於 4°C 下, 以 100 伏特進行

轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 Blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4°C 下反應 overnight，之後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時，之後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25 ml substrate buffer 進行呈色反應，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即以水終止反應，並晾乾。

結果

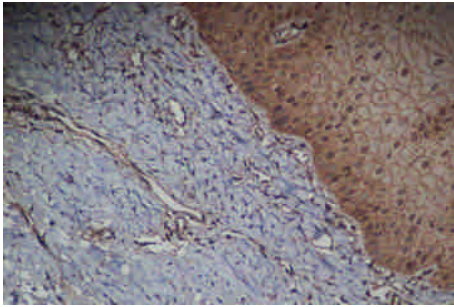


Fig. 1 Very faint immunoreactivity of LOX was observed in normal human gingival tissues (200x).

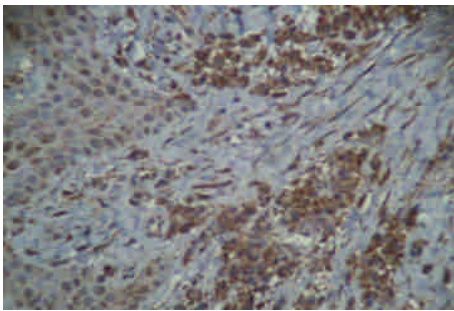


Fig. 2 Strong immunostaining for LOX was noted in the CsA-induced gingival overgrowth specimens. (400x)

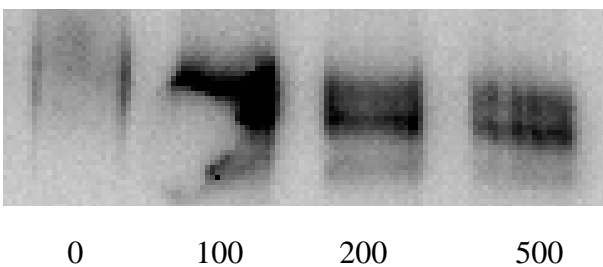


Fig. 3 LOX was found to be upregulated by CsA in a dose-dependent manner ($p > 0.05$).

參考文獻

- Atkinson K, Biggs J, Darveniza P, Boland J, Concannon A, Dodds A (1984). Cyclosporin-associated central nervous system toxicity after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 38: 34-7.
- Bellet M, Cabrol C, Sassano P, Leger P, Corvol P, Menard J (1985). Systemic hypertension after

- cardiac transplantation: effect of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Cardiol* 56: 927-31.
- Blaisdell RJ, Giri SN (1995). Mechanism of antifibrotic effect of taurine and niacin in the multidose bleomycin-hamster model of lung fibrosis: inhibition of lysyl oxidase and collagenase. *J Biochem Toxicol* 10: 203-210.
- Boak AM, Roy R, Berk J, Taylor L, Polgar P, Goldstein RH, Kagan HM (1994). Regulation of lysyl oxidase expression in lung fibroblasts by transforming growth factor-beta 1 and prostaglandin E2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 751-5.
- Di Donato A, Ghiggeri GM, Di Duca M, Jivotenko E, Acinni R, Campolo J, Ginevri F, Gusmano R (1997). Lysyl oxidase expression and collagen cross-linking during chronic adriamycin nephropathy. *Nephron* 76: 192-200.
- Goto Y, Uchio-Yamada K, Anan S, Yamamoto Y, Ogura A, Manabe N (2005). Transforming growth factor-beta mediated up-regulation of lysyl oxidase in the kidneys of hereditary nephrotic mouse with chronic renal fibrosis. *Virchows Arch* 447: 859-868.
- Greenberg A, Egel JW, Thompson ME, Hardesty RL, Griffith BP, Bahnson HT, Bernstein RL, Hastillo A, Hess ML, Puschett JB (1987). Early and late forms of cyclosporine nephrotoxicity: studies in cardiac transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 9: 12-22.
- Harris KM, Schwartz ML, Slasky BS, Nalesnik M, Makowka L (1987). Posttransplantation cyclosporine-induced lymphoproliferative disorders: clinical and radiologic manifestations. *Radiology* 162: 697-700.
- Jensen CW, Flechner SM, Van Buren CT, Frazier OH, Cooley DA, Lorber MI, Kahan BD (1987). Exacerbation of cyclosporine toxicity by concomitant administration of erythromycin. *Transplantation* 43: 263-70.
- Ma RH, Tsai CC, Shieh TY (1995). Increased lysyl oxidase activity in fibroblasts cultured from oral submucous fibrosis associated with betel nut chewing in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 24: 407-412.
- Kim Y, Peyrol S, So CK, Boyd CD, Csiszar K (1999). Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis. *J Cell Biochem* 72: 181-188.
- Ledwozyw A (1995). The effect of beta-aminopropionitrile on bleomycin- induced lung injury in rats. *Acta Physiol Hung* 83: 91-99.
- Palestine AG, Nussenblatt RB, Chan CC (1984). Side effects of systemic cyclosporine in patients not undergoing transplantation. *Am J Med* 77: 652-6.
- Rateitschak-Pluss EM, Hefti A, Lortscher R, Thiel G (1983). Initial observation that cyclosporin-A induces gingival enlargement in man. *J Clin Periodontol* 10: 237-46.
- Trivedy C, Warnakulasuriya KA, Hazarey VK, Tavassoli M, Sommer P, Johnson NW (1999). The upregulation of lysyl oxidase in oral submucous fibrosis and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28: 246-251.
- Trivedy CR, Warnakulasuriya KA, Peters TJ, Senkus R, Hazarey VK, Johnson NW (2000). Raised tissue copper levels in oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med* 29: 241-248.

出席國際學術會議心得報告

計畫編號	96-2314-B-040-034
計畫名稱	離胺基氧化酶與環孢靈誘發牙齦增生關係之探討
出國人員姓名 服務機關及職稱	張育超中山醫學大學口腔醫學研究所教授
會議時間地點	July 2-5, 2008, Toronto, ON, Canada
會議名稱	第 86 屆國際牙醫研究學會年會 86th General Session & Exhibition of the IADR
發表論文題目	Increased MMP-9 and t-PA expression in human osteoblasts by nicotine

一、參加會議經過

今年的國際牙醫研究學會年會於加拿大多倫多舉行，本屆年會盛況空前共有 3597 篇論文發表，其論文發表形式分為 oral presentation、poster presentation、poster discussion 三種。筆者今年報告的論文題目為” Increased MMP-9 and t-PA expression in human osteoblasts by nicotine”屬於牙周病學組。

國際牙醫研究學會年會是當今牙醫界最大且地位最高的學術會議，目前共分為 Behavioral Sciences & Health Services Research、Cariology Research、Craniofacial Biology、Dental Materials、 Diagnostic Systems、Dental Anesthesiology Research、Education Research、Geriatric Oral Research、Implantology Research、Microbiology/Immunology、Mineralized Tissue、Neuroscience、Nutrition Research、Oral Health Research、Oral & Maxillofacial Surgery、Oral Medicine & Pathology、Periodontal Research、Pharmacology/Therapeutics/Toxicology、Prosthodontics Research、Pulp Biology、Salivary Research 等 21 個組別。其官方出版的期刊 Journal of Dental Research 是牙科高 impact factor 的期刊。

二、與會心得

本次盛會收穫良多，吸取了許多寶貴的經驗及目前研究的新方向，對於往後的研究裨益良多，再此亦非常感激國科會予以經費補助參與此次國際牙醫研究學會年會。國際牙醫研究學會已受到政治的藉入，臺灣無法自己成立單獨的 division，目前歸在 South-East Asian Division，而中共加入即自成 China Division，政府應正視此一現象。