

Nicotine과 NNK가 치은 섬유아세포에 미치는 영향

황치훈 · 박미영* · 박광균* · 최성호 · 조규성 · 김종관 · 채중규

연세대학교 치과대학 치주과학교실
연세대학교 치과대학 구강생물학교실*

I. 서론

국민건강에 위대한 영향을 주는 흡연은 폐질환, 심혈관 질환, 치주질환 형성에 위험요소이며 중앙 발생과도 밀접한 관련이 있다. 흡연과 치주질환 관계 조사에서 보면 개인 상태를 고려한 연구에서 Stoltenberg 등¹⁾은 흡연군이 더 많은 치조골 소실을 보여주었고, Bergström 등²⁾에 따르면 흡연군이 치태 요소와는 무관하게 치조골 소실이 많았으며, Lindhe 등³⁾은 치주염이 흡연 경력과 깊은 관련성을 보고하였다. 또한 Solomon 등⁴⁾은 흡연자에서 치주 질환의 정도가 더 심해짐을 확인하였으며 Ismail 등⁵⁾과 Bolin 등⁶⁾은 흡연이 치주질환이 발현되는데 있어 중요한 위험인자임을 밝힌바 있다.

치은조직의 세포 성분 대부분은 섬유아세포이며 형태는 방추형 혹은 성상형이며, 기능은 섬유와 결합조직의 기질을 생성하며 DNA와 단백질을 생성한다. 교원질은 치은 전체 단백질의 60%를 차지하는 주요 단백질이다. 치은에 존재하는 교원질은 I형 교원질이 가장 많으며, III형과 V형 교원질도 소량 존재한다⁷⁾. 섬유아세포는 또한 교원질 분해에도 관여하여 collagenase(MMP-1)를 분비하여 I형 교원질을 분해한다⁸⁾.

흡연의 주성분인 Nicotine이 여러 종류의 세포 형태에 미치는 직접적인 조절 효과는 세포 형태에 따

라 다르게 나타난다. 즉, 골아세포 유사 세포(osteoblast-like cell)에서 Nicotine은 교원질 생합성을 억제하나⁹⁾, 배양된 피부 섬유아세포에서는 교원질 합성이 증가된다¹⁰⁾. 또한 심장의 섬유아세포에서는 10 μ g/ml Nicotine 처리시 pro α_1 의 mRNA가 31% 감소되었으나, pro α_2 는 영향을 받지 않았으며, collagenase 효소 활성이 62%나 감소된다¹¹⁾. Nicotine은 또한 세포핵의 수를 증가시켜 RNA 합성에 영향을 준다¹²⁾.

이상적인 창상 치유시 섬유아세포의 재생능력과 치아 부착능력이 중요하며, 흡연군에서 치주수술후에 나타나는 손상된 치유반응 기전은 잘 알려져 있지 않다¹³⁾. Nicotine이 치은 섬유아세포에 미치는 in vitro 실험들을 보면 Murray 등¹⁴⁾은 흡연자의 치근에서 일반적으로 Nicotine을 채취할 수 있었으며, Hanes 등¹⁵⁾은 Nicotine이 치은 섬유아세포에 비특이적으로 결합하여 세포내로 흡수된다고 하였다. 치은 섬유아세포 부착에 관한 Nicotine효과를 보면 Raulin 등¹²⁾은 인간의 foreskin 섬유아세포가 유리와 치근에서 부착과 성장에서 손상받은 것을 관찰 하였다. 그러나 foreskin 섬유아세포가 신생아 조직에서 기원하였기 때문에 성인 치주조직에서 기원한 치은 섬유아세포와는 다른 양상을 보여준다. 즉 Peacock 등¹⁶⁾은 plastic 배지에 부착된 치은 섬유아세포는 Nicotine에 자극효과 현상을 발견했다. 그러나 이것은 치은 섬

유아 세포가 교원질, fibronectin, 다른 세포의 기질단백과 결합시 Nicotine의 효과를 측정하지 않았다. 비록 Nicotine이 치은 섬유아세포부착을 변화시키지만 치은 섬유아세포에 미치는 기전은 잘 알려지지 않고 있다.

담배 연기에는 일산화 탄소(2 - 20 mg)가 가장 많이 들어 있으며, 담배 한개피에 Nicotine이 0.1 - 2 mg이 나 들어 있다¹⁷⁾. 또한 흡연시 특이하게 존재하는 nitrosamine인 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(또는 Nicotine- derived nitrosaminoketone; NNK)도 소량 들어있다. 흡연자에서 폐암을 일으키는 가장 유력한 발암물질로 알려진 NNK는 조직 특이성이 있고^{18), 19)} cytochrome P450에 의해 활성화된다²⁰⁾. 또한 생체내에서는 Nicotine이 nitrosation에 의해 methylation과 pyridyloxobutylation 과정을 거쳐 NNK가 생성될 수도 있으며, 이 물질에 의해 생성되는 pyridyloxobutylated DNA 부산물은 O⁶-methylguanine 수복을 억제하는데 이것이 발암물질로 작용하는 이유중 하나로 알려지고 있으며²¹⁾ 이 대사 과정은 Fig 1과 같다. 이처럼 Nicotine은 생체내에서 NNK로 대사되어 활성을 나타낼 수도 있으나, 흡연시 연기속에는 이미 NNK가 소량 존재하고 있어서 흡연으로 인한 치주질환 영향이 Nicotine으로 인한 단독 효과인지, 아니면 Nicotine과 NNK가 별도의 과정을 통해 치주 질환에 영향을 미치는지는 잘 알려져 있지 않다. 또한 치은 조직에서 Nicotine이 신속하

게 흡수되며, 치주 질환과 밀접한 관련이 있다고 알려졌으나, 그 정확한 기전 역시 아직 밝혀지지 않았다.

그러므로 본 실험에서는 치은에 가장 많이 존재하고, 치은 섬유아세포로부터 합성이 되는 교원질을 중심으로 Nicotine과 NNK가 치은섬유아 세포에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 치은 섬유아세포에서 Nicotine과 NNK의 잠재적인 세포성 효과를 이해하고자 교원질 유전자 발현을 보기 위하여 교원질의 mRNA level을 보았으며, 이 교원질이 세포 밖으로 분비된 후 분해도를 관찰하기 위하여 교원질을 분해하는 효소인 collagenase와 gelatinase 효소 활성을 측정하였으며, collagenase의 유전자 표현을 알아보기 위하여 collagenase의 mRNA level도 동시에 분석하였다.

즉, 본 실험에서는 치은 섬유아세포의 중요한 기능인 교원질 합성과 collagenase 분비를 중심으로 Nicotine과 NNK가 이 세포에 미치는 영향과 Nicotine이 NNK로 대사되어 작용을 나타내는 것인지, 혹은 Nicotine과 NNK가 서로 다른 경로를 통하여 치은 섬유아세포에 영향을 주는지 관찰하고자 본 실험을 시행하였다. 이러한 실험 목적을 보다 기초적으로 이해하고자 Nicotine과 NNK의 돌연변이성을 관찰하여 유전자 수준에서 영향을 줄 수 있는지를 보았으며, 치은 섬유아세포가 치주조직 및 창상 치유 유지에 필수적인 단백질을 분비하므로 Nicotine과

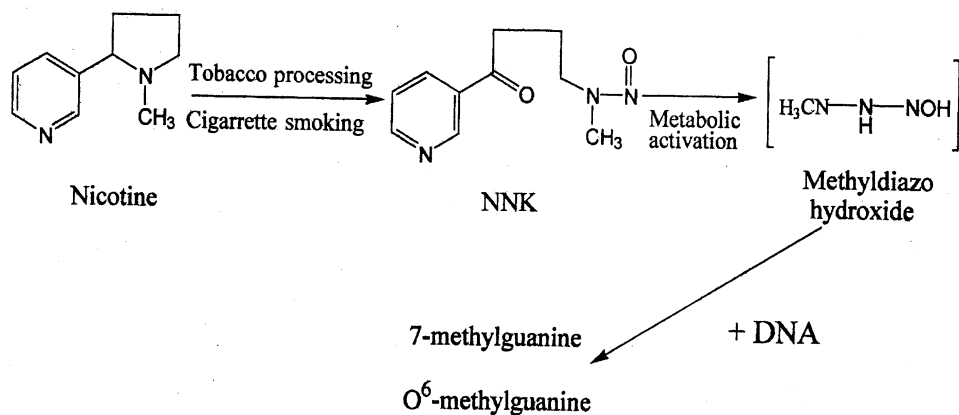


Fig 1. Formation of DNA adducts from Nicotine and NNK

NNK가 치은 섬유아세포의 성장에 미치는 영향도 함께 관찰하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 연구방법

1. 실험재료

(1) 치은 섬유아세포의 배양

건강한 비흡연자 및 흡연자의 염증이 없는 치은 조직을 채취하여 치은 섬유아세포를 기초배양하였다. 그 후 modified eagle medium(MEM)에서 10% fetal bovine serum과 1% antibiotics를 첨가하면서 5% CO₂가 공급되는 37℃ 배양기에서 계대배양하였다. 본 실험에서는 섬유아세포의 passage number가 2에서 10에 해당되는 세포를 사용하였다.

(2) 실험 시약

1. Nicotine*: 순도 98% 이상의 순수한 니코틴 용액을 사용하였다.
2. NNK**(Nicotine-derived nitrosaminoketone) : 4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone을 0.9%NaCl에 용해하여 사용하였다.

2. 연구방법

(1) 돌연변이성 실험

Nicotine과 NNK의 돌연변이성을 측정하기 위하여 Ames test를 이용하였다²²⁾. 먼저 *Salmonella typhimurium* TA 1535*를 Oxoid nutrient broth medium에서 배양하였다. 10시간 에서 11시간동안 키운 *Salmonella typhimurium* TA 1535 100 μ l에 S9 상층액을 포함하거나 포함하지 않은 상태에서 Nicotine 혹은 NNK를 첨가한 혼합액 600 μ l를 넣는

다. S9 분획은 6 - 8주의 ICR계 생쥐를 사용하여 3-methylcholanthrene을 체중kg당 50mg을 복강에 주입한 후, 48시간 후에 생쥐의 복부를 절개하여 간을 적출하고, 균등액으로 만들어 9,000 \times g에서 원심분리하여 상층액(S9 fraction)을 만들어 단백질 농도가 2 mg/ml가 되도록 조정하여 사용하였다. 본 실험에서 Nicotine과 NNK의 대사 여부를 알기 위하여 cytochrome P450을 함유하는 S9 상층액을 이용하여 대사가 가능하도록 하였다. 즉, S9 상층액을 함유한 경우에는 cytochrome P450에 의해 화합물이 대사가 될 수 있기 때문에 대사가 된 경우에는 대사 산물의 돌연변이성을 관찰 하였고, S9 상층액이 함유되지 않은 경우에는 대사가 되지 않은 상태에서 원래의 Nicotine 이나 NNK의 돌연변이성을 보았다. Nicotine이 대사되는 경우에는 다양한 종류의 N-nitrosamine이 형성될 수 있으며, 이중 한 경로는 NNK가 합성되는 경로이다. NNK는 대사가 되면 methyldiazo hydroxide로 대사가 된다. S9 상층액은 10% S9 추출물, 33 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 5 mM glucose-6-phosphate, 4 mM NADP, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4, sterile distilled water를 포함한다. 이 혼합액을 37℃ rotary shaker에서 20분간 배양한 후, 0.5 mM histidine 과 biotin을 포함한 top agar 2ml에 넣어 잘 섞고, 이를 minimal glucose plates에 부었다. 이 plates가 굳도록 상온에 잠시 놓아둔 후 37℃ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 His⁺ revertant colony 수를 세어 돌연변이성을 측정하였다.

(2) MTT test

살아있는 세포의 대사활성을 측정하기 위한 방법으로 MTT(Microtiter assay which uses the tetrazolium salt)를 사용하며, 세포 증식이나 세포독성을 측정하는데 널리 사용되고 있다^{23, 24)}. Tetrazolium salts⁸⁾는

Sigma Chemical Company, USA

TRC Toronto Research Chemicals Inc.

* 한국 화학연구소, 한국

\$ Sigma Chemical Company, USA

오직 대사적으로 활성이 있는 세포에 의해서만 절단이 되기 때문에 이 실험법은 살아 있는 세포만을 정량하게 된다. MTT test는 Succinate Dehydrogenase Inhibitor(SDI) 이라고도 부르며, 이러한 SDI 실험시 살아있는 세포에 의해 MTT가 환원되어 색이 있는 불용성 formazan salt로 된다. 이 불용성 염기를 용해하여 형성된 formazan의 양을 정량하여 세포 증식이나 세포 독성을 측정하는데 널리 사용된다. 본 실험에서는 치은 섬유아세포를 96-well plate에 1×10^4 개씩 각각의 well에 분주한 후 24시간이 지난 다음 세포가 부착하면 Nicotine과 NNK를 $10 \mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml 의 농도가 되도록 각 well에 처리하였다. 그런후 48시간 마다 Nicotine과 NNK를 재처리하면서 MTT 방법을 이용하여 530 nm에서 세포의 흡광도를 측정하였다.

MTT test는 다음과 같이 측정하였다. 먼저 96-well plate내 Nicotine과 NNK를 포함한 배지를 버리고 MTT stock solution을 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 이를 37°C 에서 24시간동안 놓아두었다. 배양이 끝나면 배양액은 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 $100 \mu\text{l}$ 씩 각 well에 분주하였다. 30분간 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포가 없이 DMSO만 처리한 well을 blank로 지정하여 그 상대값을 정하였다.

(3) RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Nicotine과 NNK에 의한 치은 섬유아세포에서 collagen과 collagenase의 유전자 표현을 검사하기

위하여 RT-PCR을 시행하였다. 먼저 섬유아세포를 75-cm^2 flask에 2×10^6 개씩 분주하였다. 24시간이 지나 세포가 부착하면 배지를 버리고 PBS로 세포를 씻은 후 Nicotine 혹은 NNK를 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 각 flask에 처리하였다. 36시간 후 세포가 flask에 충분히 자라면 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 모았다. 이렇게 모은 세포를 1500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물에 lysis buffer(+ β -mercaptoethanol $10 \mu\text{l/ml}$) $350 \mu\text{l}$ 를 넣어 침전물을 녹였다. 이때 침전물이 녹지 않으면 10,000 rpm에서 다시금 3분간 원심분리하였다. 그 후 상층액에 70% 에탄올 $350 \mu\text{l}$ 를 넣고 잘 섞어주었다. 이를 RNeasy spin column에 넣고 10,000 rpm에서 15초간 원심분리한 후 column 밑의 용액은 버렸다. Column에 wash buffer RW1 $700 \mu\text{l}$ 를 처리하고 10,000 rpm에서 15초간 원심분리하였다. 다시 column 밑의 용액은 버리고 column에 wash buffer RPE $500 \mu\text{l}$ 를 처리하여 10,000 rpm에서 15초간 원심분리하였다. Column 밑의 용액은 다시 버리고 wash buffer RPE $500 \mu\text{l}$ 를 처리하여 10,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. DEPC가 처리된 증류수 $30\text{-}50 \mu\text{l}$ 를 column에 처리하여 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA의 농도는 260nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 각 실험군과 대조군의 RNA $1 \mu\text{g}$ 에 RNase-free water를 넣고 $70\text{-}80^\circ\text{C}$ 에서 3분간 끓인 후 얼음위에서 식혔다. 짧게 원심분리하여 tube의 벽에 붙은 RNA를 모았다. 여기에 primer $0.5 \mu\text{g}$, $5 \times$ buffer, 2.5 mM dNTP, RNasin inhibitor

Table 1. Sense primer and antisense primer sequences for type I collagen α_1 and α_2 chained, and collagenase used in these experiment

primers	sequence
α_1 chain	sense primer : 5' -ACgTgTCTgTgACgACCA-3'
	antisense primer : 5' -gACgACCAggTTTCCCAgCTT-3'
α_2 chain	sense primer : 5' -CITCCTggTAATCCTggAgCAA-3'
	antisense primer : 5' -gggCgACCAgCATCTCCATTA-3'
collagenase	sense primer : 5' -CAGATgTggACCATgCCATTgA-3'
	antisense primer : 5' -AAGgTTAgCTTACTgTCACACg-3'

(25unit), M-MLV RT(200 unit)를 총 25 μ l가 되도록 넣은 후 잘 섞어주었다. 이 혼합액을 42℃에서 1시간동안 배양 후 70 - 80℃에서 10분간 끓이고 짧게 원심분리하였다. 합성된 cDNA를 다량 증폭하기위해서 cDNA, 10 \times buffer, 2.5 mM dNTP, primer 0.4 pmol/ μ l, Taq polymerase 5 unit/ μ l를 혼합하여 총 50 μ l가 되도록 잘 섞어주었다. 이를 PCR machine[†]에서는 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서도 1분으로 30 cycles의 조건으로 증폭하였다. PCR이 끝나면 1.5% agarose gel을 이용하여 생성물을 전기영동한 후 결과를 확인하였다. 실험에 사용된 collagen α_1 chain과 α_2 chain 및 collagenase에 대한 sense primer와 antisense primer는 Table 1과 같다.

(4) Zymography

세포밖으로 분비되는 collagen은 교원질을 분해하는 효소인 collagenase(주로 I, II 및 III 형 교원질을 분해)와 gelatinase(주로 IV, V 및 VII형 교원질을 분해)에 의해 분해될 수 있기 때문에 이들 효소의 활성을 검사하기 위하여 zymography를 시행하였다. 섬유아세포를 75-cm² flask에 2 \times 10⁶개씩 분주하였다. 하루가 지나 세포가 부착하면 배지를 버리고 PBS로 세포를 씻은 후 Nicotine 혹은 NNK를 10 μ g/ml의 농도가 되도록 각 flask에 처리하였다. 삼 사일 후 세포가 flask에 딱 자라면 배지를 버리고 serum-free medium을 처리하였다. 24시간 후 배양액을 모아 이중 15 μ l를 취하여 zymography를 행하여 collagenase와 gelatinase의 활성을 조사하였다. 이를 위하여 8% Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. 우선 1% gelatin[♣](gelatinase 활성 검사의 경우)이나 40 μ g/ml rat tail tendon collagen type I[●](collagenase성 검사의 경우)을 포함한 8% gel을 만들었다. Gel이 굳으면 준비한 단백질을 끓이지 않고 각 well에 20 μ l씩 분주한다. 그 후 3시간동안 20 mA/100V로 전류를 주어 단

백질을 분리하였다. 전기영동이 끝나면 상온에서 washing solution(2.5% Triton X-100 ; Tris-Cl, pH 7.5 ; 0.05% sodium azide)을 1시간씩 3번을 처리하여 gel을 씻어주었다. 그 후 배양액(0.15 M NaCl ; 10 mM CaCl₂ ; 50 mM Tris-Cl, pH 7.5 ; 0.05% sodium azide)에 gel을 넣고 37℃에서 24시간동안 배양하였다. 이 gel을 염색액인 Coomassie Blue R-250에 넣고 2시간동안 염색하였다. 이를 탈염색액(isoprophyl alcohol: glacial, acetic acid: 증류수 = 1:1:8)에 넣고 단백질을 제외한 다른 부분을 탈색하였다.

III. 연구결과

1. Nicotine 혹은 NNK처리시 치은섬유아세포에 미치는 영향

(1) 돌연변이성 효과

Salmonella typhimurium TA 1535에 니코틴을 농도별(0 - 100mg/plate)로 처리하였을 때 S9 상층액을 첨가하여 대사 활성을 유도한 경우나 S9 상층액을 넣지 않은 경우 모두에서 돌연변이성 효과가 나타나지 않았다(Fig 2). 그러나 NNK 경우는 S9 상층액을 넣지 않은 경우에는 돌연변이성을 나타내지 않았으나, S9 상층액을 넣어 대사 활성을 유도한 경우에 농도에 따라(0 - 1.0 mg/plate) 돌연변이성을 나타내었다(Fig 3). 이러한 결과는 Nicotine의 경우에 돌연변이성을 유발하지 않기 때문에 유전자 수준에 돌연변이를 유발하여 세포 독성을 나타내지 않음을 시사하며, NNK의 경우에는 cytochrome P450에 의해 methylidazo hydroxide로 대사되어 7-methylguanine이나 O⁶-methylguanine adduct를 형성하여 돌연변이를 유발하였으며, 이러한 경우는 유전자 수준에서 영향을 줄 수 있음을 시사해준다.

(2) 섬유아세포에 미치는 세포독성의 효과

[†] Promega, USA

[♣] Junsei chemical Co. Ltd

[●] Sigma, Chemical Company, USA(Fro, Bovine Achilles Tendon)

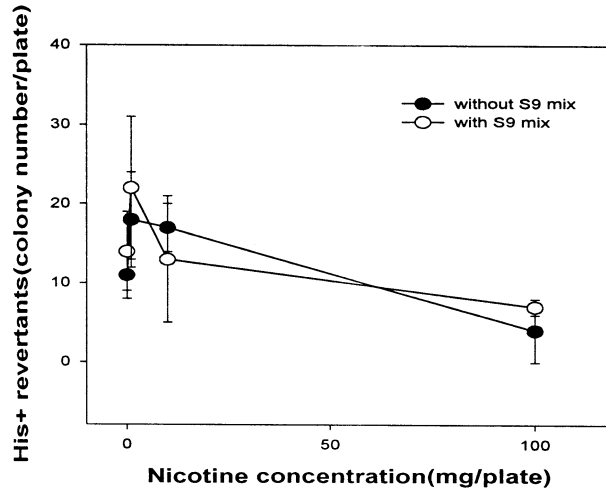


Fig 2. Mutagenesis in Salmonella typhimurium TA 1535 by nicotine

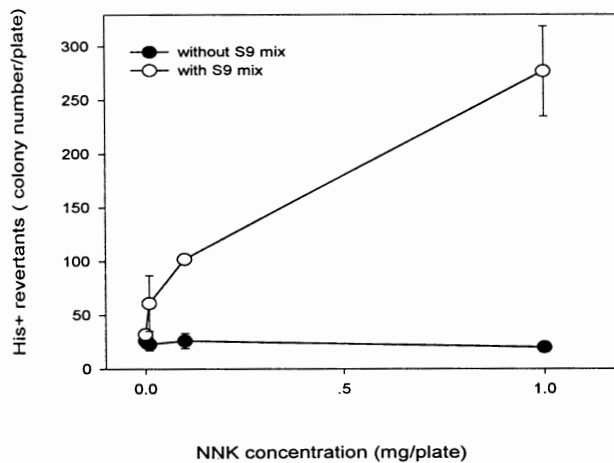


Fig 3. Mutagenesis in Salmonella typhimurium TA 1535 by NNK

MTT test를 이용한 실험에서 흡연자와 비흡연자 치은에서 얻은 섬유아세포의 세포 증식을 비교한 결과, 비흡연조직으로부터 얻은 섬유아세포가 흡연조직으로부터 얻은 세포에 비해 성장률이 더 빨랐다(Fig 4). 또한 비흡연조직에서 얻은 섬유아세포에 Nicotine을 10 μ g/ml 과 1 mg/ml을 처리하였을 때 MTT test를 이용하여 이틀마다 흡광도를 측정하였다. Nicotine 10 μ g/ml을 처리한 실험군의 성장이 대조군에 비해 억제

됨을 알 수 있으며, Nicotine을 1 mg 처리한 경우에 세포 독성이 나타났다. 또한 Nicotine 1mg/ml을 처리한 실험군에서 세포의 사멸이 관찰되었다(Fig 5). NNK의 경우에도 10 μ g/ml을 처리한 실험군은 대조군에 비해 성장이 억제되었으며, NNK 1mg/ml을 처리한 실험군 역시 대조군과 비교시 성장이 보다 억제되지만 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(Fig 6).

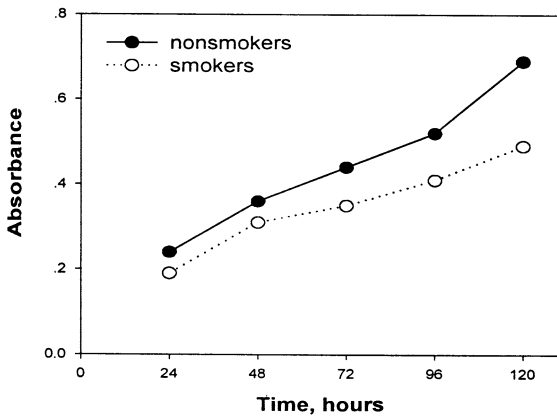


Fig 4. The comparison of growth between nonsmokers and smokers' cell

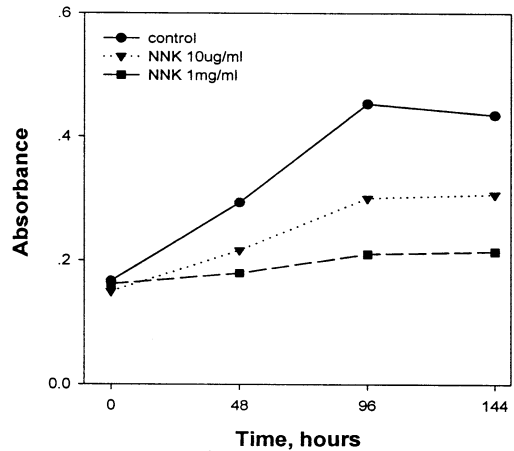


Fig 6. The effect of NNK treatment on nonsmokers' gingival fibroblast cells

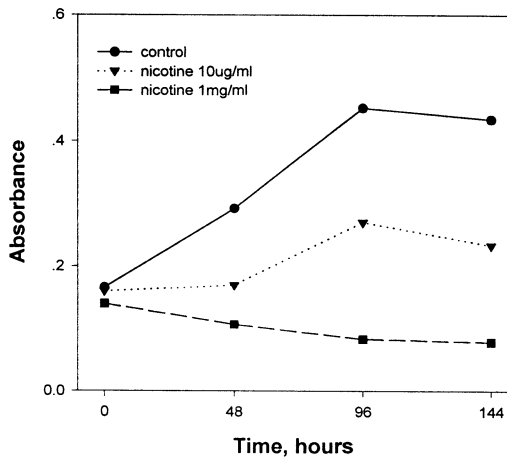


Fig 5. The effect of nicotine treatment on nonsmokers' gingival fibroblast cells

2. Nicotine과 NNK가 치은 섬유아세포의 collagen과 collagenase 발현에 미치는 영향

(1) 단백질의 합성에 미치는 영향

Tipton²⁵⁾ 등에 의하면 Nicotine과 NNK를 처리하였을 때 섬유아세포의 collagen type I 양이 비교적 농도 의존적으로 대조군에 비해 감소한다고 하였다. 이를 바탕으로 collagen type I의 양이 어떠한 방식으

로 조절되는지 관찰하였다. 먼저 단백질 합성의 측면에서 조절되는지 알아보기 위해, collagen type I의 subunit α_1 과 α_2 의 mRNA양을 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. 그 결과 subunit α_1 의 경우, 대조군과 비교하여 Nicotine을 처리한 실험군의 mRNA의 양은 변화가 없었다. 그러나 NNK를 처리한 실험군은 고농도로 처리했을 때 대조군에 비해 mRNA 양이 감소되었다. Subunit α_2 의 경우에는 Nicotine과 NNK를 처리한 실험군과 대조군 비교결과 차이가 없었다 (Fig 7). Collagen을 분해하는 효소인 collagenase의 mRNA의 양을 조사한 결과 Nicotine에서는 변화가 없었고 NNK 10 μ g/ml를 처리한 실험군에서만 대조군에 비해 mRNA의 양이 감소함이 관찰되었다(Fig 7).

(2) 단백질의 분해에 미치는 영향

다음으로 collagen type I, II 및 III를 분해하는 interstitial collagenase 활성과 type IV, V 및 VII collagen을 분해하는 gelatinase의 활성을 조사하여 단백질 분해 측면에서 조절되는지를 보기 위하여 Nicotine이나 NNK에 노출한 후에 배양액 상층액에서 효소활성을 측정하였다. Collagenase 활성을 비교시 Nicotine과 NNK를 처리한 실험군은 대조군에 비해 그 활성이 컸으며, 그 활성은 흡연조직에서 얻

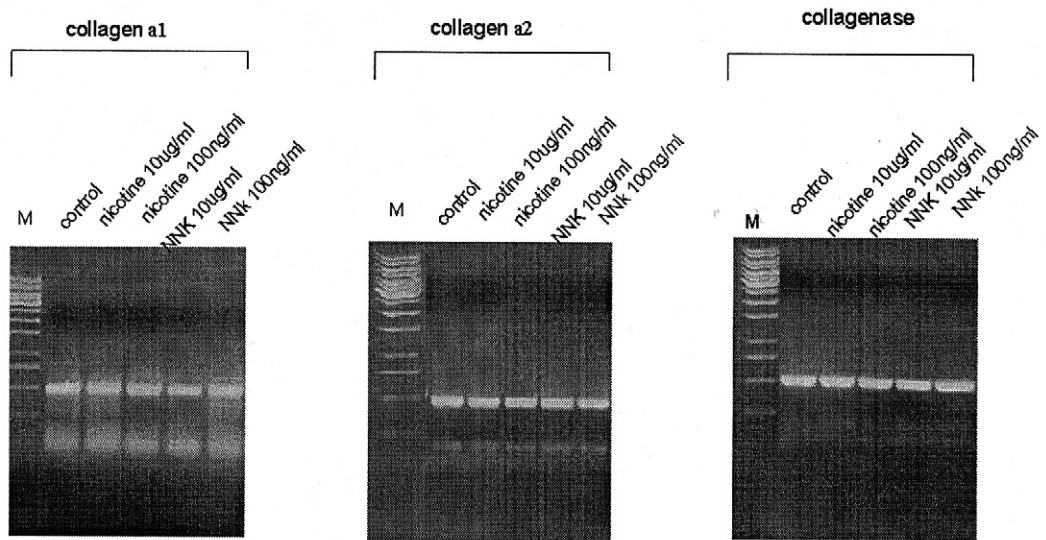


Fig 7. The effect of mRNA level of collagen α_1 , α_2 and collagenase on gingival fibroblasts after nicotine or NNK treatment

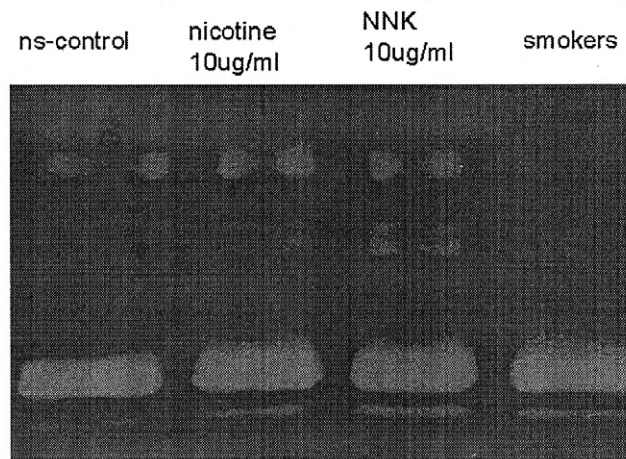


Fig 8. The effect of collagenase activity on gingival fibroblasts after nicotine or NNK treatment

은 섬유아세포의 대조군과 비슷하였다(Fig 8). 그러나 gelatinase 활성은 대조군과 실험군간에 차이가 없었다(Fig 9).

IV. 총괄 및 고찰

흡연은 뇌혈관질환, 심혈관 질환, 위장관 및 폐쇄성 폐질환을 포함한 다양한 조직에서 위험인자로 알

려져 있다. 이와 같이 생명을 위협하는 질환들 이외에도 흡연은 급성 괴사성 궤양성 치은염과 연관되어 있으며²⁶⁾ 구강 종양에 대한 위험도를 증가시킨다. 흡연자와 비흡연자의 치주 건강에 미치는 영향에 대한 연구는 지난 40년 동안 꾸준히 이어져 왔다. 그러나 최근까지의 치주 질환 진행에 대한 흡연의 효과는 명백하게 규명되지 못하고 있다. 치주 질환 원인에 있어 담배연기의 정확한 역할은 아직 확립되지 못한

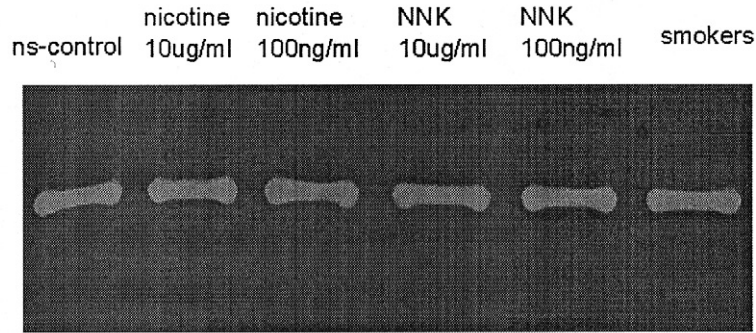


Fig 9. The effect of gelatinase activity on gingival fibroblasts after nicotine or NNK treatment

상태이며 역학적인 자료만이 흡연이 위험인자임을 암시해주고 있는 실정이다²⁷⁾.

흡연과 치주질환의 상관관계에 대한 연구를 통하여 흡연은 치태의 증감과 관계없이 치조골 소실을 야기한다는 보고가 있다²⁾. Pindborg²⁶⁾는 흡연이 피사성 궤양성 치은염의 위험 인자라고 하였으며, 담배 연기가 구강조직에 직접 영향을 준다고 보고하였다. 치은 퇴축과 치조골 손실의 평가에 근거하여 Solomon 등⁴⁾은 피운 담배의 개피수가 치주 질환의 발병율과 밀접한 상관관계가 있음을 밝혔다. Feldman 등²⁸⁾은 cigarette smoker와 pipe/cigar smoker 및 비흡연자 사이에서 치주질환 지수를 비교하여 비흡연군에 비하여 두가지 흡연군 모두에서 치석의 침착이 현저히 많음을 보고하였다. 또한 이들은 흡연이 전신적인 영향을 주어 골 손실이 야기된다고 보고한바 있다. Ismail 등⁵⁾은 흡연이 치주질환과 직접 관련이 있으며, 나이, 성별, 인종 및 구강 위생 상태, 사회 경제적 상태 등은 상관이 없다고 하였다. 그러나 이러한 역학적인 연구가 흡연과 치주 질환의 관계를 확립하였다고 하더라도 아직 생물학적 기전은 밝혀진바 없다.

흡연의 위해한 영향은 약리학적으로 활성 물질인 Nicotine과 가장 관련있다. Nicotine은 대부분 폐포를 통해 흡수되고 일부는 피부나 구강점막을 통해 천천히 흡수되며 특히 혈류에 급속히 흡수되어지며 30%는 자유기(free form)로 남으며 지용성이 강하여 세포막을 쉽게 통과한다. 약리학적 작용은 acetylcholine 작용과 같이 자율 신경절 내의

Nicotine성 수용체와 결합하여 초기에 흥분작용을 나타내며, 그후 신경절 봉쇄 현상마저 일어난다²⁷⁾. 부신(adrenal glands)에서 유리된 epinephrine과 동맥 혈관 벽에서 norepinephrine이 방출되는데, 이것은 심혈관 계통에 영향을 미치며 특히 말초혈관 수축은 치은 혈류 감소를 야기하고 그 영향으로 필수 영양분 공급과 국소면역체제 효능을 감소시켜 창상의 회복을 지연시킨다는 보고가 있다^{29),30)}.

구강내 정상균총은 병원균과 경쟁하여 치주질환 형성을 억제한다. 흡연은 이런 정상균총의 생활력을 감소시키며, 병원균에 대한 면역력을 감소시켜준다. Bardell 등³¹⁾의 in vitro 실험에서 흡연은 streptococci, staphylococci의 생활력을 감소시키며, Preber 등³²⁾도 흡연이 정상균총을 변화시키지만 병원균의 양적 증가를 유도하지는 않는다고 보고한바 있다.

Nicotine은 면역체제와 지역방어 기전에 손상을 야기한다. 다형핵 백혈구 Polymorphonuclear leukocyte(PMN)는 염증반응에서 제일 먼저 나타나는 방어물질로서³³⁾ 당뇨에서처럼 PMN 기능 이상인 있는 환자에서는 치주질환 발생위험이 증가한다는 것은 주지의 사실이다^{34, 35)}. 흡연은 PMN 주화성과 식균작용 기능을 억제한다고 보고되었으며³⁶⁾ 구강 PMN과 다르게 순환계 PMN은 정상 식균작용외에도 감소된 주화성 반응을 보인다³⁷⁾. 구강 PMN의 식균 작용 능력저하는 상충 치주조직에서 염증정도를 낮추는 용해소체 효소 방출을 감소시킨다.

흡연의 주성분인 Nicotine은 치은 섬유아세포나 면역계 세포를 위시한 다양한 종류의 세포에 부작용

을 나타낸다. 예를 들면 흡연은 호중구의 식균작용을 억제하고 대식세포의 기능을 억제함으로써 이들 세포들이 치주질환을 야기시키는 세균들에 대항하여 싸울 수 있는 능력을 저하시킨다^{36, 24)}.

흡연군에서 만성적인 염증이 다양하게 나타남에도 불구하고 치은 염증과 흡연과의 관계에 대한 연구는 많지가 않다^{38, 39)}. 염증성 치은에서 활성화된 대식세포의 영향은 interleukin-1 β 나 tumor necrosis factor- α 를 생성하여 상주하고 있는 치은 섬유아세포가 치주조직 파괴를 야기시킬 수 있는 collagenase나 기타 다른 효소들을 분비하도록 자극한다⁴⁰⁾. 뿐만 아니라 담배나 Nicotine과 같은 흡연 성분이 치은 섬유아세포에 미치는 직접적인 영향으로 흡연자의 치주조직이 손상되기도 한다. 예를 들면 사람의 치은 섬유아세포는 시험관에서 Nicotine을 신속하게 섭취하여 고농도로 축적하며 이들 Nicotine의 대부분이 섬유아세포내에 남아 있어서 세포의 대사와 기능에 영향을 준다¹⁵⁾. 인간의 치은 섬유아세포가 Nicotine에 노출되면 이들의 세포 증식에 영향을 주어 in vitro에서 유리에 대한 부착력이나 치아 치근면에 대한 부착력이 저하된다^{16, 12)}.

면역반응에도 영향을 미치는데 Roszman 등⁴¹⁾의 in vitro상에서 lymphocyte에 대한 흡연반응은 IgM과 IgG 반응이 억제됨을 보여주었으며, 그 외 연구에서도 helper-suppressor T cell ratio⁴²⁾, 세포분열물질로 유도된 임파구 형질전환(mitogen induced lymphocyte transformation)⁴³⁾, 자연살 세포독성 활성(natural killer cytotoxic activity)⁴⁴⁾의 감소를 보고하였다.

위와 같은 연구결과로 보아 흡연은 치주질환 발병을 가속시키며 치료후 치유를 어렵게하는 면역억제 작용이 있다. 흡연자 모두에서 일관되게 면역억제 작용이 나타나지는 않으며⁴⁵⁾ 소량 흡연자와 비흡연자의 면역기능에도 별다른 차이가 없음이 보고되었다^{46, 44)}.

흡연자의 혈중 Nicotine 농도는 15ng/ml~73ng/ml이며 씹는 담배를 사용하는 사람의 타액 농도는 70~1560ng/ml로 차이가 있다. 직접 영향을 받는 구강점막 조직을 고려할 때 본 실험에서는 예비실험을

통해 세포의 기능변화가 분명히 나타나는 100ng/ml에서 10 μ g/ml 농도를 선택하였다.

본 실험에서 Nicotine은 구강의 치은 섬유아세포의 세포 증식을 억제하였으며, NNK 역시 치은 섬유아세포의 세포증식을 억제하였다. 고농도(1mg/ml)의 Nicotine을 처리한 경우 세포 독성에 의해 세포의 사멸현상이 나타났지만 NNK의 경우에는 세포 독성을 나타내지 않았다. 이것은 Nicotine이나 NNK가 모두 세포의 증식을 억제는 하지만 그 작용 기전이 다를 수 있음을 암시하고 있다. 고농도 Nicotine에 노출시 살아있는 세포수의 감소현상은 세포주기의 변화로 인한 복제능력의 이상으로 분화되는 세포형태가 훨씬 둥근 모습을 보이는데 이런 현상으로 세포의 부착 능력 저하를 가져오거나 세포조작동안 많은 세포손실을 가져올 수도 있다. 또한 Nicotine에 노출시 세포내 내부 농도가 위해한 정도까지 축적될 때에는 세포분화의 자극원으로 작용할 수 있으나 내부 농도가 증가되어 역치 이상인 경우 독성에 의해 세포가 사멸되거나 혹은 Nicotine이 소포에 의해 격리되면서 대사활동이 점차 활발해지면서 다시 증식을 할 수도 있다. 비 흡연자와 흡연자의 치은 조직의 MTT test를 통하여 본 흡연자의 세포 증식이 비흡연자의 세포 증식에 비해 현저히 감소되었음을 볼 수 있었다. 이러한 사실은 흡연자의 경우 담배 연기속의 어떤 성분이 치은 조직의 세포 증식을 억제하고 있으며, 본 실험에도 Nicotine이나 NNK가 치은 조직의 세포 증식을 억제하고 있음으로, 담배 연기속에 있는 이들 성분에 의해 치은 조직의 세포 증식이 억제되는데 일부 관여하고 있음을 볼 수 있었다. 돌연변이성 실험에서 Nicotine은 대사활성을 위한 S9 상층액 존재 하에서도 돌연변이성을 나타내지 못하였으며 이런 결과는 Nicotine이 돌연변이성이 없다는 보고와도 일치하였다^{47, 48)}. Nicotine의 경우에는 달리 NNK의 경우는 대사 활성이 없는 경우에도 돌연변이성을 나타내지 않았지만, S9상층액으로 대사 활성을 유도한 경우에는 농도 의존적으로 돌연변이성을 나타내었다. 이것은 NNK 자체 만으로는 돌연변이성이 없지만 세포내 대사과정을 거쳐 보다 활성이 있는 methyl diazo hydroxide 화합물을 생성하여, 반응성

이 강한 친전자성 물질로 바뀐 후, 생체내 친핵성 물질인 DNA와 결합하여 7-methylguanine이나 O⁶-methylguanine adduct를 형성하고 DNA 복제과정중에 A-T, G-C 염기 쌍을 이루지 못하여 돌연변이가 일어났음을 의미한다. 결과적으로 Nicotine은 대사 활성화가 되지 못하여 유전자 수준에서 돌연변이를 야기하지 않지만, NNK의 경우에는 DNA adduct를 형성하여 유전자 수준에 영향을 줄 수 있음을 시사해 준다. 본 실험에서는 Nicotine이 I 형 교원질의 mRNA 수준에는 영향을 주지 못하였으나, Nicotine이 collagenase 효소 활성을 증가 시켰다. Tipton과 Dabbus(1995년) 등²⁵⁾이 사람 치은 섬유아세포에서 Nicotine에 의해 교원 단백질이 현저히 감소하고, 교원질을 분해하는 collagenase 효소활성이 증가되었다는 보고와 본 실험의 결과를 토대로 교원질의 mRNA 수준에서는 영향을 받지 않으나, 세포밖으로 분비된 후에 증가된 collagenase 효소 활성화에 의해 collagen이 분해되어 collagen의 양이 감소된 것으로 유추할 수가 있었다. 또한 Ramp 등⁹⁾은 osteoblast-like cell에서 Nicotine이 교원질 합성을 억제한다고 보고한 반면에, Chamson과 Frey¹⁰⁾는 피부 섬유아세포에서 교원질 합성이 증가되었다고 보고하였다. 최근에 Tomek 등¹¹⁾은 심장 섬유아세포에서 Nicotine이 교원질 pro α_1 mRNA 수준을 31% 감소 시키며, pro α_2 에는 영향을 주지 않으며, collagenase의 효소 활성은 62%나 감소된다고 보고하여, Nicotine이 교원질 pro α_1 mRNA 수준에 직접 영향을 주지 않는다는 본 실험의 연구 결과와는 상이 하였다. 이것은 여러 다양한 세포에 대한 Nicotine의 직접적인 영향이 보고되었으며, 각각의 세포 형태에 따라 나타나는 효과도 서로 다르게 나타나는 것으로 보아 사용된 세포의 차이에서 기인 되었거나 실험 방법의 차이(본 실험에서는 RT-PCR 방법을 사용하였으나, Tomek 등의 방법에서는 RNA-DNA hybridization 방법을 사용하였다)에서 기인 되었으리라 사료된다. 특히 DNA 합성과 세포 증식에 대한 Nicotine의 효과는 연구된 세포의 종류에 따라 다르게 보고되고 있다. 즉, 쥐의 뇌세포⁴⁹⁾와 사람의 백혈병 세포⁵⁰⁾에서는 DNA 합성이 감소되나, HeLa cell⁵¹⁾, 사람 폐 섬유아세포⁵¹⁾, 사

람 태아 섬유아세포⁵¹⁾는 영향을 받지 않는다. 세포 증식에 대한 효과에 있어서도 Nicotine이 치은 섬유아세포의 세포 증식을 억제한다고 보고되었으나²⁵⁾, Peacock 등¹⁶⁾은 낮은 농도의 Nicotine(0.025 μ M)에서 치은 섬유아세포는 세포 증식이 현저히 증가된다고 보고 하였다. 본 실험에서는 전자와 같은 농도에서 치은 섬유아세포의 세포 증식이 억제되었다. 이렇게 구강의 치은에서 유래된 섬유아세포의 경우에도 Nicotine에 대한 효과가 이질적으로 나타나는 이유 중 농도차 이외에도 섬유아세포 자체의 이질성(heterogeneity)에서 기인된다는 보고는 많다⁵³⁻⁵⁷⁾. 서로 다른 사람에서 분리된 사람 치은 섬유아세포의 경우에도 cyclosporin에 대한 반응이 다르게 나온 경우도 보고된바 있다⁵⁷⁾.

본 실험에서는 담배연기속에 존재하는 nitrosamine 화합물인 NNK가 collagen과 collagenase 효소 활성이 미치는 영향을 실험하였다. NNK는 Nicotine 과는 달리 교원질 pro α_1 mRNA 수준이 감소되었으며, pro α_2 는 영향을 받지 않았으며, collagenase mRNA의 경우에는 감소현상을 나타내었다. 또한 collagen 분해 효소활성에 있어서도 collagenase 효소 활성이 증가되어 있었으나, gelatinase 효소 활성에서는 대조군과 차이가 없었다. 이러한 결과는 세포내에서 합성되는 교원질의 양도 감소가 되고, 세포밖으로 분비된 후에도 분해가 많이되어 Nicotine의 효과에서 보다 교원질이 보다 작게 존재할 가능성을 암시해 준다고 사료된다.

교원질을 분해하는 collagenase 효소 활성화에 대한 Nicotine의 조절 효과는 아직 보고된바 없다. 아마도 이러한 조절은 단백질의 전사과정, 전구체의 활성화, 억제물질의 작용 등 여러 가지 방법에 의해 일어나리라 사료된다. Nicotine이 collagenase 유전자의 전사로서 직접 자극하거나 섬유아세포로부터 cytokine의 생산을 유도하여 간접적으로 작용할 가능성이 있다. 섬유아세포는 다양한 종류의 cytokine을 생산하며, 자가분비(autocrine) 방법으로 interleukin-1 β 는 collagenase 효소활성을 자극하며, collagenase 유전자의 전사를 자극한다.

지금까지의 여러 실험을 통하여 Nicotine이 치은

섬유아세포에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 진행되었으나 그 정확한 기전을 이해하기 위하여는 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 사료된다. 즉, Nicotine이 collagen의 mRNA에 미치는 영향 이후에 mRNA로부터 만들어 지는 교원질 단백질 과정과 교원질 합성후의 분비과정, 나아가 전구체로 형성된 procollagen이 tropocollagen으로 되는 과정, collagen 섬유 형성 과정 등, 아직도 많은 과정에 대한 Nicotine의 영향이 연구되어야 하며, 본 실험에서 처음 시도된 NNK가 치은 섬유아세포에 미치는 영향은 앞으로 더 많이 연구되어야 할 부분이라고 사료된다.

V. 결론

Nicotine과 NNK가 사람 치은 섬유아세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 이들 화합물의 돌연변이성 실험, 세포 증식을 보기위한 MIT test, 교원질과 collagenase의 mRNA 수준 및 교원질 분해 효소의 효소활성들을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Nicotine은 대사 활성계의 존재 여부와 상관없이 돌연변이성을 나타내지 않았고 NNK의 경우에는 그 자체로는 돌연변이성이 없었으나, 대사활성제가 존재하는 경우에 농도의존적으로 돌연변이성을 나타내었다.
2. 증식능 실험에서 흡연자의 세포증식능은 비흡연자에 비해 감소되었다.
3. 비흡연자의 치은 섬유아세포에 Nicotine과 NNK를 처리한 경우에 대조군에 비해 농도의존적으로 세포 증식능이 감소되었으며, 고농도에서 Nicotine의 경우 세포 독성을 나타내었으나, NNK는 세포독성을 나타내지 않았다.
4. 교원질 분자의 mRNA 수준에 대한 Nicotine의 효과는 $\text{pro}\alpha_1$ 과 $\text{pro}\alpha_2$ 모두에 영향을 주지 않았고, NNK는 $\text{pro}\alpha_1$ 의 경우에는 감소하였으나, $\text{pro}\alpha_2$ 에는 영향을 주지 않았다.
5. Collagenase의 mRNA 수준에 대한 효과에서 Nicotine은 없었으나 NNK는 감소하였다.
6. 교원질 분해 효소에 대한 Nicotine과 NNK의 효

과는 I형 교원질의 분해 효소를 알기 위한 collagenase 효소 활성의 경우에는 효과가 모두 증가되었으나, IV형 교원질의 분해 효소인 gelatinase 효소 활성에는 영향을 주지 않았다. 또한 흡연자의 collagenase 효소활성은 비흡연자의 치은 섬유아세포에 Nicotine이나 NNK를 처리한 경우와 비슷한 수준으로 증가되었다.

이상의 결과로 보아 Nicotine과 NNK는 모두 치은 섬유아세포에 영향을 주어 교원질의 양을 감소시키며, 그 기전에 있어서는 서로 다른 경로를 통하여 일어나는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Stoltenberg, J. L., Osborn, J. B., Pihlstrom, B. L., Herzberg, M. C., Aeppli, D. M., Wolff, L. F. and Fischer, G. E. : Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status, *J Periodontol*, 64:1225-1230, 1993.
2. Bergström, J., Eliasson, S. and Preber, H. : Cigarette smoking aids periodontal bone loss, *J Periodontol*, 62:242-246, 1991.
3. Linden, G. J., Mullally, B. H. : Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults, *J Periodontol*, 65: 718-723, 1994.
4. Solomon, H. A., Priore, R.L. and Bross, I. D. J. : Cigarette smoking and periodontal disease, *J Am Dent Assoc*, 77: 1081-1084, 1968.
5. Ismail, A., Burt, B. and Edlunk, S., : Epidemiologic patterns of smoking and periodontal disease in the United States, *J Am Dent Assoc*, 106:617-621, 1983.
6. Bolin, A., Lavstedt, S., Frithiof, L., Henrikson, C. : Proximal alveolar bone loss in a longitudinal radiographic investigation. IV. Smoking and other factors influence the progress of individuals with at least 20 remaining teeth, *Acta Odontol Scand*, 44:263-

- 269, 1986.
7. Dabbous, M., Hammouda, O. and Brinkley, B. : Isolation and partial characterization of bovine gingival AB collagen, *Mol Cell Biochem*, 34:87-93, 1981.
8. Birkedal-Hansen, H. : Collagenase in periodontal disease. In: Wooley DE, Evanson JM, eds. *Collagenase in Normal and Pathological Connective Tissues*. New York: John Wiley & Sons, Ltd.; pp.127-140, 1980.
9. Ramp, W. K., Lenz, L. G. and Galvin, R. J. S. : Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells, *PSEBM* 36-43, 1991.
10. Chamson, A., Frey, J. and Hivert, M. : Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell cultures, *J Toxicol Environ Health*, 9:921-932, 1982.
11. Tomek, R. J., Rimar, A. and Eghbali-Webb, M. : Nicotine regulates gene expression, collagenase activity, and DNA synthesis in cultured cardiac fibroblasts, *Mol Cell Biochem*, 136:97-103, 1994.
12. Raulin, L. A., et al. : The effect of Nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surface in vitro, *J Periodontol*, 59:318-325, 1988.
13. Preber, H., Bergström, J. : Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy, *J Clin Periodontol*, 17:324-328, 1990.
14. Murray, J. A., Cuff, M.J. and Mc-Quade, M. J. : The presence of Nicotine on root surfaces of periodontal diseased teeth in smokers, *J Periodontol*, 60:564-569, 1989.
15. Hanes, P., Schuster, G. S. and Lubas, S. : Binding, uptake and release of Nicotine by human gingival fibroblasts, *J periodontol*, 62:147-152, 1991.
16. Peacock, M. E., et al. : The effect of Nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblast in vitro, *J Periodontol*, 64:658-665, 1993.
17. Ellenhorn, M. J., Schonwald, S., Ordog, G., Wasserberger, J. : *Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning*, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp.1110-1111, 1997.
18. Hecht, S. S., Hoffmann, D. : Tobacco-specific nitrosamines. an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke, *Carcinogenesis*, 9:875-884, 1988.
19. Hecht, S. S., Hoffmann, D. : The relevance of tobacco specific nitrosamines to human cancer, *Cancer Surv*, 8:273-294, 1989.
20. Crespi, C. L., Penman, B. W., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J. : A tobacco smoke derived nitrosamine. 4-(methylnitrosamino)- 1-(3-pyridyl)- 1- butanone, is activated by multiple human cytochrome P-450s including polymorphic human cytochrome P-450 2D6, *Carcinogenesis*, 12:1197-1201, 1991.
21. Pererson, L. A., Lin, X. K. and Hecht, S. S. : Pyridyloxobutyl DNA adducts inhibit the repair of O-methylguanine, *Cancer Res*, 53:2780-2785, 1993.
22. Maron, D. M., and Ames, B. N., *Mutat. Res*, 113-173, 1983.
23. Mosmann, T. J. : *Immuno Methods*, 65:55, 1983.
24. Vistica, D. T., et al. : *Cancer Res*, 51:2515, 1991.
25. Tipton, D. A., Daddous, M. K. : Effects of Nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro, *J Periodontol*, 66:1056-1063, 1995.

26. Pindborg, J. J. : tobacco and gingivitis I, Statistical examination of the significance of ulceromembranous gingivitis and in the formation of calculus, *J Dent Res*, 26:261-264, 1947.
27. Bridget, Turnbull : Smoking and periodontal disease, *J new Zealand Soc periodontol*, 79:10-15, 1995.
28. Feldman, R. S., et al. : Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes, *J Periodontol*, 54:481-487, 1983.
29. Clarke, N. G. and Shepherd, B. C. : The effects of epinephrine and Nicotine on gingival blood flow in the rabbit, *Arch Oral Biol*, 29:789-793, 1984.
30. Mosely, L. H., Finseth, F. : Cigarette smoking : impairment of digital blood flow and wound healing in the hand, *Hand*, 9:97-100, 1977.
31. Bardell, D. and Smith, J. E. : An in vitro study of mixed populations of normal oropharyngeal bacteria to cigarette smoke, *Microbios*, 26:159-164, 1979.
32. Preber, H., Bergström, J. and Linder, L. : Occurrence of periopathogens in smoker and non smoker patients, *J Clin Periodontol*, 19:667-671, 1992.
33. Schenfeld, S., Checci, L. : Review of immunology for the periodontist, *J west Soc Periodontol*, 33:53-64, 1985.
34. Bissada, N. F., et al. : Neutrophil functional activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis, *J Periodont Res*, 17:500-502, 1982.
35. McMullen, J. A., et al. : Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus, *J Periodontol*, 52:167-173, 1981.
36. Kenney, E. B., Kraal, J. H. and Saxe, S. R. : The effect of cigarette smoke on human polymorphonuclear leukocytes, *J Periodont Res*, 12:227-234, 1977.
37. Noble, R. C., Penny, B. B. : Comparison of leucocyte count and function in smoking and non smoking young men, *Infect Immun*, 12:550-555, 1975.
38. Feldman, R. S., Alman, J. E. and Chauncey, H. H. : Periodontal disease indices and tobacco smoking in healthy aging man, *Gerodontology*, 1:43-46, 1987.
39. Hedin, C. A., Ronquist, G. and Forsberg, O. : Cyclic nucleotide content of gingival tissue of smokers and nonsmokers, *J Periodont Res*, 16:337-343, 1981.
40. Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G. and Bodden, M. K. : Matrix metalloproteinase: A review, *Crit Rev Oral Biol Med*, 4:197-250, 1993.
41. Roszman, T. I., Rogers, A. S. : The immunosuppressive potential of products derived from cigarette smoke, *Am Rev Respir Dis*, 108:115, 1973.
42. Miller, L., Goldstein, G. and Murphy, M. : Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking, *Chest*, 82:526-529, 1982.
43. Petersen, B., Steimel, L. and Callaghan, J. : Suppression of mitogen-induced lymphocyte transformation in cigarette smokers, *Clin Immunol Immunopathol*, 27:135-140, 1983.
44. Philips, B., Marshall, M. E. and Brown, S. : Effect of smoking on human natural killer cell activity, *Cancer*, 56:2789-2792, 1985.
45. Tollerud, D., Brown, L. and Blattner, W. : T cell subsets in healthy black smokers and nonsmokers: evidence for ethnic group as an important responses modifier, *Am Rev Respir Dis*, 144:612-616, 1991.

46. Nakachi, K., Imai, K. : Environmental and physiological influences on human natural killer cell activity in relation to good health practices, *Jpn J Cancer Res*, 83:798-805, 1992.
47. Chin K. Lee, et al. : Inhibition of mutagenicity of N-nitrosamines by tobacco smoke and its constituents, *Mutat Res*, 367:83-92, 1996.
48. David, J., et al. : The genotoxic potential of Nicotine and its major metabolites, *Mutat Res*, 344:95-102, 1995.
49. Slotkin, T. A., Orband-Miller, L., Queen, K. L., Whitmore, W. L. : Effects of prenatal Nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: Maternal drug infusion via osmotic minipump, *J Pharmacol Exp Ther*, 240:602-611, 1987.
50. Konno, S., Chiao, J. W. and Wu, J. M. : Effects of Nicotine on cellular proliferation, cell cycle phase distribution, and macromolecular synthesis in human promyelocytic HL-60 leukemia cells, *Cancer Lett(Netherlands)*, 33:91-97, 1986.
51. Altmann, H., Weniger, P. and Dolejs, I. : Influence of Nicotine on DNA metabolism, *Klin Wochenschr*, 62(Suppl. 2):101-104, 1984.
52. Csonka, E., Somogyi, A., Augustin, J., Haberbosch, W., Schetter, G., Jellinek, H. : The effect of Nicotine on cultured cells of vascular origin, *Virchows Arch[Pathol Anat]*, 407:441-447, 1985.
53. Bordin, S., Page, R. and Narayanan, A. : Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts : isolation and characterization of one phenotype, *Science*, 223 : 171-173, 1984.
54. Hassell, T., Stanek, E. : Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations, *Arch Oral Biol*, 28:617-625, 1983.
55. Ko, S. D., Page, R. C. and Narayanan, A. S. : Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations, *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 74:3429-3432, 1977.
56. Milunsky, A., Spielvogel, L. and Kaufer, J. : Lysozomal enzyme variation in cultured normal skin fibroblasts, *Life Sci*, 11:1101-1107, 1972.
57. Tipton, D. A., Daddous, M. K., : Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to cyclosporine, *J Cell Biochem*, 46:152-165, 1991.

Nicotine과 NNK가 치은 섬유아세포에 미치는 영향

본 실험에서는 치주질환 발병에 위험인자이고 창상치유에 위대한 영향을 미치는 흡연이 치주조직에 미치는 반응을 규명하기 위해 치은 섬유아세포의 중요한 기능인 교원질 합성과 분비된 단백질 분해에 영향을 주는 효소활성도를 중심으로 Nicotine과 NNK가 이 세포에 미치는 영향을 관찰하고 또한 Nicotine이 NNK로 대사되어 작용을 나타내는 것인지, Nicotine과 NNK가 서로 다른 경로를 통하여 치은 섬유아세포에 영향을 주는지를 규명하고자 이들 화합물의 돌연변이성 실험, 세포 증식을 보기위한 MTT test와 교원질과 collagenase의 mRNA 수준 및 교원질 분해 효소의 효소활성들을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Nicotine은 대사 활성계의 존재 여부와 상관없이 돌연변이성을 나타내지 않았고 NNK의 경우에는 그 자체로는 돌연변이성이 없었으나, 대사활성계가 존재하는 경우에 농도의존적으로 돌연변이성을 나타내었다.
2. 증식능 실험에서 흡연자의 세포증식능은 비흡연자에 비해 감소되었다.
3. 비흡연자의 치은 섬유아세포에 Nicotine과 NNK를 처리한 경우에 대조군에 비해 농도 의존적으로 세포 증식능이 감소되었으며, 고농도에서 Nicotine의 경우 세포 독성을 나타내었으나, NNK는 세포독성을 나타내지 않았다.
4. 교원질 분자의 mRNA 수준에 대한 Nicotine의 효과는 $\text{pro}\alpha_1$ 과 $\text{pro}\alpha_2$ 모두에 영향을 주지 않았고, NNK는 $\text{pro}\alpha_1$ 의 경우에는 감소하였으나, $\text{pro}\alpha_2$ 에는 영향을 주지 않았다.
5. Collagenase의 mRNA 수준에 대한 효과에서 Nicotine은 없었으나 NNK는 감소하였다.
6. 교원질 분해 효소에 대한 Nicotine과 NNK의 효과는 I형 교원질의 분해 효소를 알기 위한 collagenase 효소 활성의 경우에는 효과가 모두 증가되었으나, IV형 교원질의 분해 효소인 gelatinase 효소 활성에는 영향을 주지 않았다. 또한 흡연자의 collagenase 효소활성은 비흡연자의 치은 섬유아세포에 Nicotine이나 NNK를 처리한 경우와 비슷한 수준으로 증가되었다.

이상의 결과로 보아 Nicotine과 NNK는 모두 치은 섬유아세포에 영향을 주어 교원질의 양을 감소시키며, 그 기전은 서로 다른 경로를 통하여 일어나는 것으로 사료된다.

The Effects of Nicotine and NNK on gingival fibroblast

Chi Hoon Hwang, Mi-Young Park*, Kwang-Kyun Park*, Seong-Ho Choi,

Kyoo-Sung Cho, Chong-Kwan Kim, Jung-Kiu Chai

Department of Periodontology, Dental College, Yonsei University

*Department of Oral biology, Dental College, Yonsei University

In order to observe the effects of Nicotine and NNK on cultured human gingival fibroblast, several factors were examined including mutagenicity, the number of cells attached culture plate surface through MTT test, the abundance of collagen & collagenase in mRNA level and collagenolytic activity in extracellular matrix. The results were as follows;

1. Regardless of the co-existence of S9, Nicotine did not show the mutagenicity by itself and NNK by itself showed the same result; However, dose related mutagenicity was shown in NNK with S9.
2. The number of fibroblasts attached cultured plate surface was measured by MTT procedure. The number of cells in Non-smokers increased at all time periods as compared to those of smoker.
3. Non-smoker's fibroblast treated by NNK or Nicotine was dose-dependently decreased in the number of cells when compared to untreated control. In higher dose, Nicotine showed the cellular toxicity, but NNK did not.
4. No change in the abundance of mRNA for $\text{pro}\alpha_1$ and $\text{pro}\alpha_2$ was shown in Nicotine treated group but in gingival fibroblasts following treatment with NNK, the abundance of mRNA for $\text{pro}\alpha_1$, but not $\text{pro}\alpha_2$ collagen was decreased.
5. The abundance of mRNA for collagenase was decreased when NNK was treated but no change occurred in Nicotine treated group.
6. The effect of NNK and Nicotine in collagenolytic activity showed that, collagenase activity exclusively react to type I collagen, was increased in both group, but gelatinase exclusively react to type IV collagen was not influenced at all.

Collagenase activity of smoker's fibroblast was also increased as much as Nicotine and NNK group.

The findings suggest that both of Nicotine and NNK lead gingival fibroblast to decrease in the abundance of collagen. And it seems to be that Nicotine and NNK have independent pathway toward the gingival fibroblast.

Key words: Nicotine, NNK, collagen, collagenolytic activity, mutagenicity