

니코틴 농도에 따른 치은 섬유아세포의 증식 억제에 대한 연구

한강욱¹, 이천희², 이준행³, 전열매⁴, 유현준⁴¹단국대학교 일반대학원 보건학과, ²안동과학대학교 치위생과, 단국대학교 치과대학 ³소아치과, ⁴예방치과

Studies on inhibition of gingival fibroblast proliferation by nicotine concentration

Kang-Uk Han¹, Cheon-Hee Lee², Joon-Haeng Lee³, Yeol-Mae Jeon⁴, Hyun-Jun Yoo⁴¹Department of Oral Health, College of Health Science, Dankook University, Cheonan,²Department of Dental Hygiene, Andong Science College, Andong,Departments of ³Pediatric Dentistry and ⁴Preventive Dentistry, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan, Korea

Received: November 23, 2020

Revised: December 9, 2020

Accepted: December 9, 2020

Corresponding Author: Hyun-Jun Yoo

Department of Preventive Dentistry,
College of Dentistry, Dankook University,
119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan
31116, Korea

Tel: +82-41-550-0311

Fax: +82-41-553-6582

E-mail: dent.preventive@gmail.com

https://orcid.org/0000-0002-0100-8309

*이 논문은 한강욱의 2019년 박사 학위 논문의
일부를 발췌하였음.**Objectives:** To investigate the effect of nicotine on the healing of an oral cavity wound, high and low concentrations of nicotine were administered on human gingival fibroblasts.**Methods:** Nicotine at concentrations of 0.1, 1, 5, and 10 mM were administered to gingival fibroblasts to evaluate the survival capability of the cells. Nicotine at 0.1 mM, a nonapoptotic concentration, was administered to evaluate apoptosis using Annexin V-FITC/Propidium Iodide cell staining. Nicotine at 1, 10, and 100 μ M were administered to measure the expression of inflammatory cytokines, which was measured by RT-PCR and ELISA. FGF was treated with an additional 1, 10, or 100 μ M of nicotine to evaluate cell proliferation and wound healing.**Results:** As the concentration of nicotine increased (0.1, 1, 5, and 10 mM), the survival capability of the cells reduced. When cells were exposed to low nicotine concentration (0.1 mM) for 24 h, apoptosis occurred. Moreover, if the cell was exposed for 48 h, cell apoptosis occurred with necrosis. As the concentration of nicotine increased (1, 10, and 100 μ M), more inflammatory cytokines were expressed. When EC LPS and TF LPS were combined with a low concentration of nicotine (1 and 10 μ M), the expression of inflammatory cytokines was suppressed. The FGF level decreased as the nicotine concentration increased (1, 10, and 100 μ M).**Conclusions:** Nicotine interferes with the wound healing process of gingival fibroblasts. To maintain the wound healing process after a surgery or dental procedure, cessation of smoking is recommended.**Key Words:** Fibroblasts, Necrosis, Nicotine

서론

국제연합(United Nation, UN)은 2025년까지 비감염성질환에 의한 사망률을 25% 감소시키겠다는 목표를 설정하고, 비감염성질환의 예방과 관리에 있어 금연의 중요성에 대한 인식하에 현재의 흡연을 감소를 주요 전략으로 삼고 있다. 만성 비감염성 질환(Non-Communicable Diseases: NCDs)은 감염성, 전염성이 없고 대체적으로 질병의 진행 속도가 느리고 유병 기간이 긴 특성을 가지고 있다. 대표적으로

암, 심혈관계질환, 당뇨, 만성호흡기질환 등을 말한다¹⁾.

흡연과 관련된 구강질환으로는 치주질환, 구강암, 구강칸디다증, 구취 및 착색 등 다양한 질환에 영향을 주고 있다고 밝혀졌다. 11년 관찰 코호트 연구에서 흡연의 구강암 사망에 대한 비교위험도를 남성에서 4.58배로 보고하였고²⁾, Yun 등은 구강암 발생의 위험도가 과거흡연자 남성에서 1.53배, 현재 흡연자 남성에서 1.75배 높다고 보고하였다³⁾. 흡연자는 비흡연자에 비해 구강암 발생이 2-5배 높고, 흡연량과 흡연 기간에 비례하여 위험도가 커진다고 하였다⁴⁾. 흡연자는 치주질환

발생 가능성이 비흡연자에 비해 3.25배에서 7.28배 높다고 보고되었다⁵⁾.

흡연에 따른 구강 내 연조직변화는 구강 내 반복적인 고열로 인하여 Stomatitis nicotia 병소를 유발하며, 면역작용이 저하되어 구강내의 방어세포가 과사 혹은 증독되기도 한다. 또한 상치치유에도 영향을 주며, 구강 내 말초혈관 수축시키고 혈관의 혈류량 감소 및 산소공급 부족을 유발시킨다고 한다⁶⁾. 흡연은 타르의 높은 접착성으로 인해 세균의 영양분을 장기간 구강 내 저류시키고, 타르에 의해 부착된 치주 질환 병원균은 치면세균막과 치석형성을 촉진시켜 치주질환의 발생을 증가시킨다⁷⁾. 흡연은 치주치료에도 영향을 주며, 흡연자의 치주치료 후 치주낭 탐침깊이와 부착수준의 개선정도가 비흡연자 회복정도보다 50-75% 수준으로 저하된다고 보고되었다⁸⁾. 또한 흡연은 구강 내 창상 치유를 지연시키고, 임플란트의 실패가 비흡연자보다 2배 이상 높다고 보고하였다⁹⁾.

니코틴이 치은 섬유아세포에 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위해 세포주기를 알아보면 세포주기는 세포 분열 직후 다음 성장과정이 시작되기 전까지 휴지기인 DNA합성 전기(G1기), DNA 복제가 이루어지는 DNA합성기(S기), 세포가 나누어지는 DNA합성 후기(G2기)와 핵분열기(M기)로 이루어져 있다. Sherr 등¹⁰⁾은 니코틴이 많은 세포주기 조절단백질에서 나타나며 세포주기 G1주기와 S주기에 영향을 준다고 하였으며, Hwang 등¹¹⁾은 흡연자의 세포증식능력은 비흡연자에 비해 감소되었고, 비흡연자의 치은 섬유아세포에 니코틴과 Nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK)을 처리한 경우 농도 의존적으로 세포 증식능력이 감소되었다고 하였다. 이와 같은 흡연의 효과들은 바로 니코틴 때문이다.

본 연구의 목적은 담배의 주성분인 니코틴을 투여하고 치은 섬유아세포의 생존율, 염증사이토카인의 발현정도를 연구하여 니코틴이 구강 내 상처 회복 능력 저해와 치은 섬유아세포 손상에 영향을 미치는지 연구하였다.

연구대상 및 방법

1. Cell culture and treatment with nicotine

본 연구에서는 사람 치은 섬유아세포 세포주인 HGF-1 (Human Gingival Fibroblast-1) 세포를 이용하였으며, ACTC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. HGF-1 세포는 10% 우태아혈청(10% fetal bovine serum) (hyclone, Logan, UT, USA)과 항생제(penicillin 100 U/ml 및 streptomycin sulfate 100 µg/ml)가 첨가된 Dulbecco Modified Eagle 배지 (DMEM) (Hyclone, Logan, UT, USA)에서 배양하였다. HGF-1을 12-well plate (Corning Co. Corning, NY, USA)에 도말하고, 세포가 80% 정도 채워질 때까지 배양하였다. 세포생존율을 조사하기 위해, HGF-1 세포는 혈청이 없는 DMEM 배지에 4시간 동안 기아상태로 유지하였고, 12시간 동안 다양한 농도(0.1, 1, 5 및 10 mM)의 니코틴 (Sigma-aldrich Co., San Jose, CA, USA)이 투여되었으며, 양성대조군으로는 대장균 지질다당류(*Escherichia coli* lipopolysaccharide, *E. coli* LPS) (Invivogen, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 다른

실험으로 세포 사멸을 평가하기 위해, HGF-1은 0.1 mM (비 살상 농도)로 48시간 처리하였다. 마지막으로 저농도에서 니코틴의 염증효과를 확인하기 위해, HGF-1은 12-well plate에 도말하고, 세포가 80% 정도 채워질 때까지 배양하였다. 혈청기아 후, 세포는 1, 10, 100 µM의 니코틴으로 12시간 동안 처리하였다. 또한 세포는 니코틴과 함께 처리하였고 *T. forsythia* LPS를 추출하였다.

2. Cell viability assay

니코틴 처리에 의한 치은 섬유아세포의 세포 생존도 분석을 하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) (Sigma-aldrich, San Jose, CA, USA) 방법을 사용하였다. MTT는 4 mg/ml의 농도로 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 용해시켰다. 니코틴 처리된 HGF의 배지를 제거하고 세포를 MTT 용액으로 처리하였다. 세포는 37°C에서 2시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하고 용액을 제거 하였다. MTT 용매(4 mM 염산 (HCl) 및 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol) 중의 0.1% NP-40)를 첨가 하였다. 세포는 orbital shaker (JEIO Tech, Daejeon)로 15분간 흔들었으며, 광학밀도는 microplate reader (Biotek, Winooski, VA, USA)로 590 nm 파장에서 측정되었다.

3. Apoptosis and necrosis assay

24시간 및 48시간 동안 니코틴 처리한 HGF는 2 mM 에틸렌디아민아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)을 포함한 phosphate buffered saline (PBS)으로 처리하여 세포 배양 접시에서 분리하였다. 세포는 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 세포는 실온 암실에서 15분 동안 결합완충용액(200 µl, 0.1 M HEPES, pH 7.4, 1.4 M 염화나트륨(NaCl), 25 mM 염화칼슘(CaCl₂))에서 1.25 µl의 Annexin V-FITC (BD bioscience, Sanjoese, CA, USA)와 반응시켰고, 요오드화 프로피디움(Propidium iodine, 0.05 mg/ml)의 4 µl를 추가하였다. 세포는 형광이용세포분류기(fluorescence-activated cell sorter, FACScalibur; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석되었다.

4. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

니코틴으로 유도된 HGF-1 세포로 4°C에서 5분간 1,500×g으로 원심 분리하여 수확하고 차가운 PBS로 2회 세척하였다. TRIzol® RNA 분리키트(Life technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 세포의 총 RNA는 분리되었다. 간단히 말하면, 세포는 TRIzol 용액 1 ml로 처리하고 15초 동안 vortex를 이용하여 혼합하였다. 혼합물은 200 µl의 클로로포름을 첨가하였고, 4°C에서 15분간 12,000×g으로 원심 분리하였다. 새 튜브에 상등액을 옮긴 후, 이소프로필 알콜을 첨가하였다. 튜브는 15분간 12,000×g으로 원심 분리하였고, 상등액을 제거하였다. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 물을 포함한 70% 에틸알콜을 튜브에 첨가하였다. 10분 동안 12,000×g으로 원심 분리한 후, 상등액을 제거하였고, 100 µl의 DEPC 물을 첨가하였다. 상보적인 DNA는 Total RNA (1 µg)와 키트

를 혼합 한 후 Maxime RT Premix 키트(iNtRON, Gyeonggi)를 이용하여 합성되었다. cDNA는 SYBR premix Ex Taq (Takara Co., Kyoto, Japan) 10 μ l, 각 프라이머의 0.4 μ M, ROX II reference dye 및 증류수와 혼합하여 총용량 20 μ l되게 하고, 혼합물은 ABI PRISM 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 95°C에서 15초간, 60°C에서 15초간, 72°C에서 33초간 40회의 PCR 반응을 수행하였다. 증폭 산물의 해리곡선을 이용하여 각 특이적 증폭 산물에 대해 PCR 산물을 조사하였다. 하우스 키핑(housekeeping) 유전자는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였으며, 이를 발현 레벨을 정상화시키고 사이토카인의 변화를 정량화하기 위한 기준으로 사용하였다. Real-time RT-PCR을 위한 프라이머의 서열은 Table 1과 같다.

5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

상기와 같이 니코틴을 처리하거나 TF LPS와 니코틴을 함께 처리한 세포의 조건 배지는 4°C에서 10분간 7,000 \times g으로 원심 분리하여 세포 잔사를 제거하였고, 상등액은 새로운 튜브로 옮겼다. 제조사의 프로토콜에 따라 ELISA 키트(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 의해 종양괴사인자- α 및 인터루킨-8 (Interleukin-8, IL-8) 수준에 대해 준비된 상등액을 분석하였다.

6. Inhibitory effect of nicotine on cell proliferation

치은 섬유아세포를 10% 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지에서 배양하고, trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 떼어트리고, 1 \times 10³ cells/ml씩 96-well 폴리스티렌 배양접시에 분주하였다. 60% 정도 찰 때까지 세포를 배양하고, 배양배지에 10 ng/ml 농도의 성장인자(fibroblast growth factor; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 넣어준 배지와, 성장인자를 포함한 배지에 여러 농도의 니코틴(1, 10 및 100 μ M)을 추가한 배지를 기존 배양배지를 제거하고 넣어주었다. 5% CO₂ 배양기에 넣고 12시간 배양한 후, 세포 성장을 MTT를 이용하여 조사하였다.

7. 통계학적 유의성 검사

통계학적 유의성 검사는 SPSS 24.0 (IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하고 Kruskal-Wallis test 및 Mann-whitney test를 이용하여 검증하였다. P 수치는 0.05 미만일 때 통계학적 유의성이 있다고 고려되었다.

Table 1. The sequences of inflammatory cytokines for real-time RT-PCR

Name	Sequences
TNF- α	Sense 5'-CAG GGA CCT CTC TCT AAT CA -3'
	Antisense 5'-AGC TGG TTA TCT CTC AGC TC -3'
IL-8	Sense 5'-GTG AAG GTG CAG TTT TGC CA-3'
	Antisense 5'-TCT CCA CAA CCC TCT GCA C-3'
GAPDH	Sense 5'-GTG GTG GAC CTG ACC TGC-3'
	Antisense 5'-TGA GCT TGA CAA AGT GGT CG-3'

연구 성적

1. MTT assay

세포의 생존도 분석은 니코틴의 농도에 따라 MTT 처리를 하였고, 평균값을 측정하였다(Table 2). 아무것도 처리하지 않은 군보다 니코틴 5 mM 처리한 군에서 통계적으로 유의하게 세포의 생존력을 감소시켰다($P<0.05$). 니코틴의 농도가 높아질수록 세포의 생존능력이 감소되었다. 니코틴 1 mM 이하에서는 니코틴을 처리하지 않은 군과 비교하여 생존력의 차이가 없었다.

형광현미경을 통하여 치은 섬유아세포를 살펴본 결과, 니코틴의 농도가 높아질수록 치은 섬유아세포가 감소하였다(Fig. 1).

2. Investigation of apoptosis and necrosis

Fig. 2를 통해 치은 섬유아세포 비사멸농도인 니코틴 0.1 mM에서 24시간, 48시간 니코틴 처리하였다. 세포자살과 괴사를 확인하기 위해 세포사멸 마커인 Annexin V-FITC와 요오드화 프로피디움(PI)에 반응시킨 후 형광이용세포분류기를 이용하여 분석하였다. 24시간 동

Table 2. The cell viability assay

		MTT assay						
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	Mean \pm SD
Nicotine	Control	0.45	0.44	0.44	0.47	0.46	0.46	0.45 \pm 0.01
	0.1 mM	0.46	0.45	0.43	0.47	0.42	0.43	0.44 \pm 0.02
	1 mM	0.45	0.44	0.45	0.44	0.43	0.45	0.44 \pm 0.01
	5 mM	0.21	0.18	0.20	0.15	0.23	0.26	0.21 \pm 0.03*
	10 mM	0.12	0.11	0.11	0.10	0.13	0.15	0.12 \pm 0.01*

The cell viability was measured by MTT and calculated percentage.

*Statistically significant difference compared with control group ($P<0.05$).

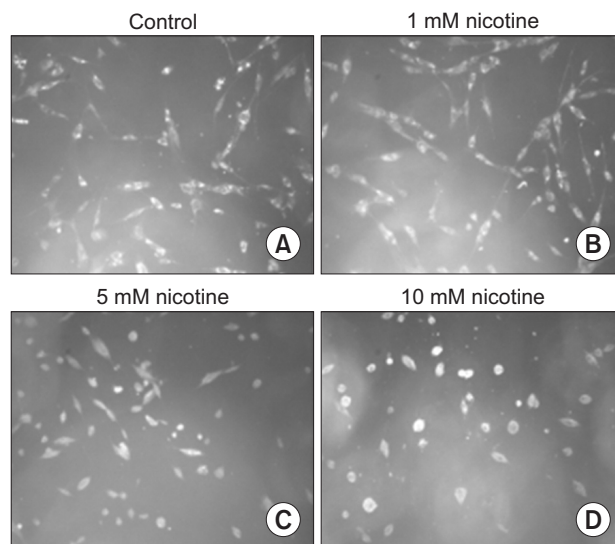


Fig. 1. Observation of cell viability. The cell viability was measured by phase-contrast microscope.

안 니코틴 처리한 치은 섬유아세포는 Annexin V와 반응하였으며, 이는 세포자살이 일어난 것으로 확인되었다.

3. Investigation of inflammation cytokines by real-time RT PCR

니코틴에 의한 치은 섬유아세포의 염증성사이토카인 발현을 알아보기 위해, Real-time RT PCR을 이용하여 측정하였다. Fig. 3에서 염증성 사이토카인 종양괴사인자- α 는 양성대조군인 *E. coli* LPS군에 비해 니코틴 1 μ M과 10 μ M 처리한 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 또한 염증성 사이토카인 인터루킨-8은 양성대조군인 *E. coli* LPS군에 비해 니코틴 1 μ M과 10 μ M 처리한 군에서 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

치은 섬유아세포에 대조군 *T. forsythia* LPS와 니코틴을 투여하여 배양한 염증성 사이토카인을 Real-time RT PCR 이용하여 측정하였다. Fig. 4에서 염증성 사이토카인 종양괴사인자- α 발현은 대조군 *T. forsythia* LPS에 비해 니코틴 1 μ M과 10 μ M를 투여한 군에서 감소

하였다($P < 0.05$). 염증성 사이토카인 인터루킨-8 발현은 *T. forsythia* LPS에 니코틴 1 μ M과 10 μ M를 투여한 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

4. Investigation of inflammation cytokines by ELISA

ELISA 키트를 이용하여 염증성 사이토카인의 발현을 측정한 결과, 염증성 사이토카인 종양괴사인자- α 는 Fig. 5와 같았다. 종양괴사인자- α 는 *E. coli* LPS만 처리한 군에 비해 니코틴 1 μ M과 10 μ M를 투여한 군에 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 그러나 니코틴 100 μ M를 투여한 군에서는 *E. coli* LPS를 투여한 군과 비슷한 염증성 사이토카인 발현을 보였다. 염증성 사이토카인 인터루킨-8 또한 종양괴사인자- α 와 비슷한 경향을 보였고, 니코틴 1 μ M과 10 μ M를 투여한 군은 대조군 *E. coli* LPS만 처리한 군보다 인터루킨-8의 발현을 감소하였다($P < 0.05$).

치은 섬유아세포에 대조군 *T. forsythia* LPS와 니코틴을 투여하여 배양한 염증성 사이토카인을 측정하였다. Fig. 6에서 염증성 사이토카

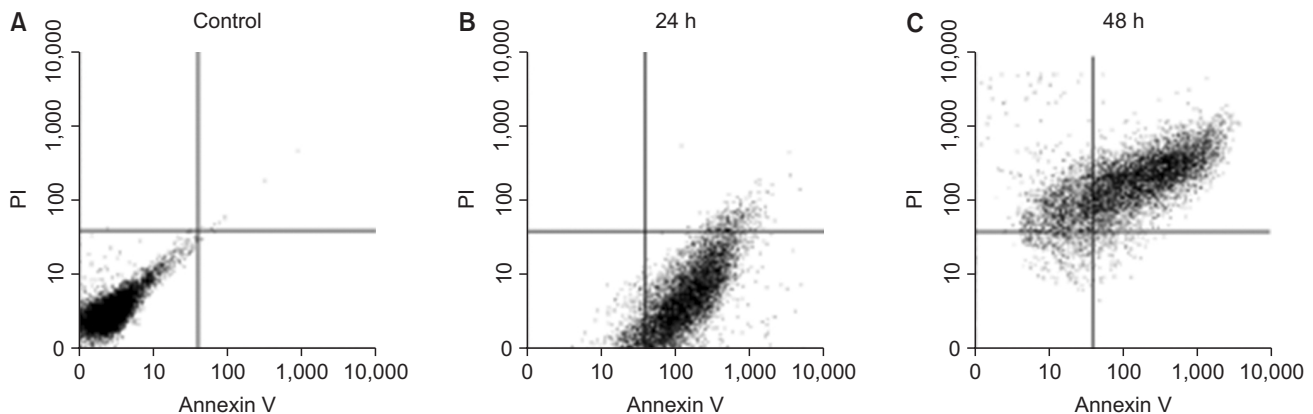


Fig. 2. Investigation of apoptosis and necrosis. Nicotine-treated HGF for 24 h and 48 h was treated with 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid in PBS to detach from cell culture dish. The cell was washed twice with cold PBS. The cells were reacted 1.25 μ l of Annexin V-FITC in Binding buffer (200 μ l; 0.1 M HEPES, pH7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl_2) for 15 min at RT in the dark and then add 4 μ l of propidium iodide (0.05 mg/ml). The cells were analyzed by a fluorescence-activated cell sorter.

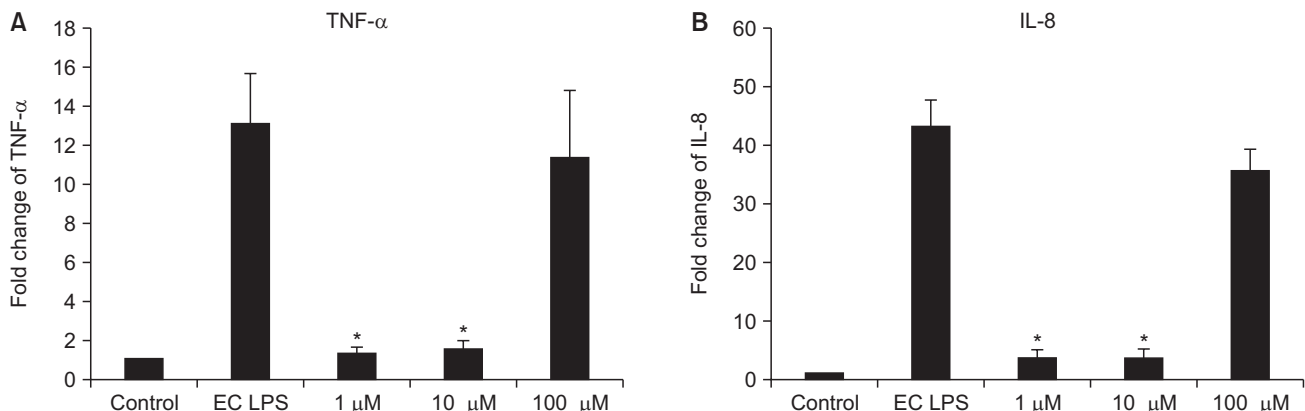


Fig. 3. Investigation of inflammation cytokines by real-time RT PCR. HGF was treated in the presence or the absence of nicotine. The cell was used to RT-PCR. *Statistically significant difference compared with *E. coli* LPS ($P < 0.05$). EC LPS, *E. coli* LPS.

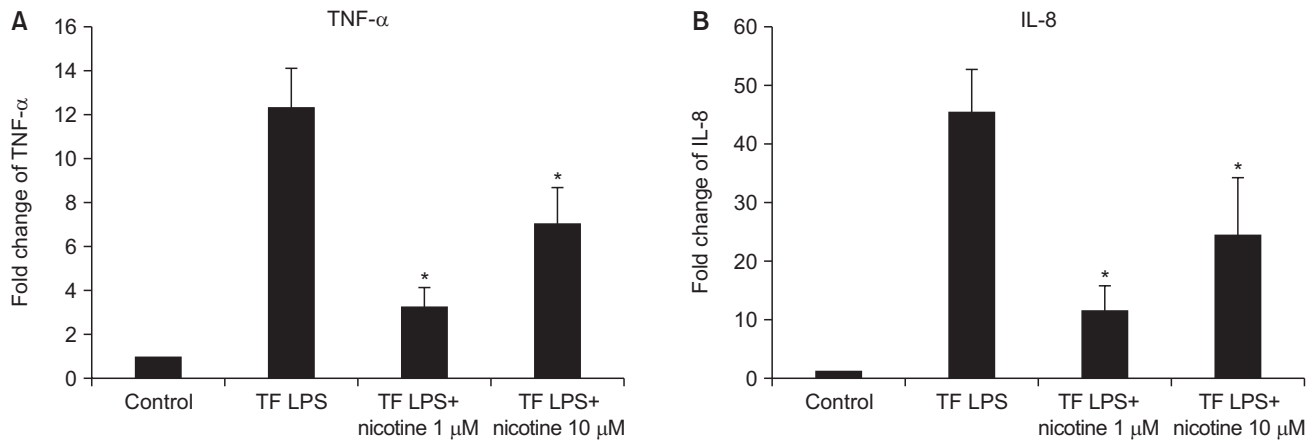


Fig. 4. Investigation of inflammation cytokines by *T. forsythia* LPS. HGF was treated with *T. forsythia* LPS in the presence or the absence of nicotine. The cell was used to RT-PCR. *Statistically significant difference compared with *T. forsythia* LPS ($P < 0.05$). TF LPS, *T. forsythia* LPS.

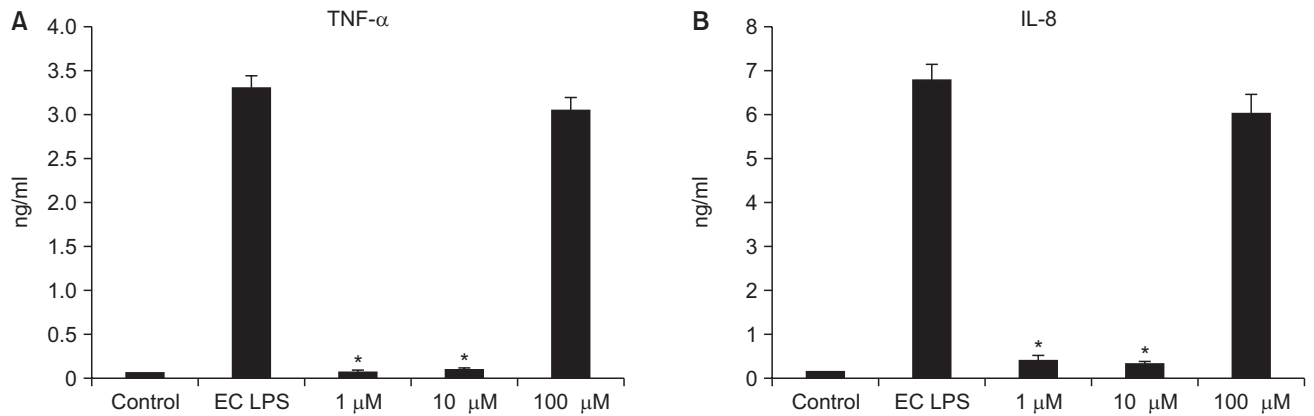


Fig. 5. Investigation of inflammation cytokines by ELISA. HGF was treated in the presence or the absence of nicotine. The cell was used to RT-PCR, and the conditioned media was used to ELISA. *Statistically significant difference compared with *E. coli* LPS ($P < 0.05$).

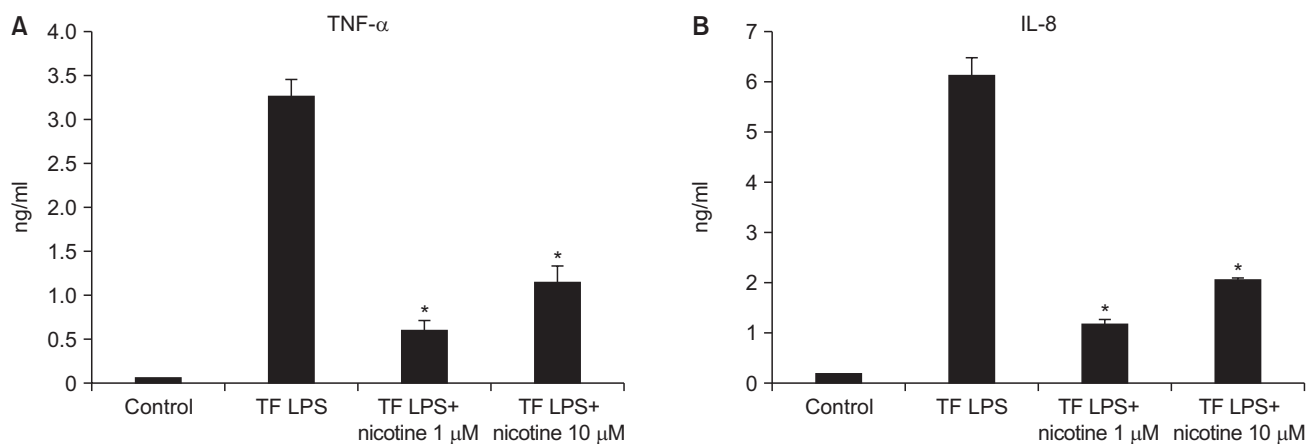


Fig. 6. Investigation of inflammation cytokines by *T. forsythia* LPS. HGF was treated with *T. forsythia* LPS in the presence or the absence of nicotine. The cell was used to RT-PCR, and the conditioned media was used to ELISA. *Statistically significant difference compared with *T. forsythia* LPS ($P < 0.05$).

인 종양괴사인자- α 발현은 대조군 *T. forsythia* LPS에 비해 니코틴 1 μ M와 10 μ M를 투여한 군에서 감소하였다($P < 0.05$). 염증성 사이토카인 인터루킨-8 발현은 *T. forsythia* LPS에 니코틴 1 μ M와 10 μ M를

투여한 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

Table 3. Inhibitory effect of nicotine on cell proliferation

	MTT assay			
	1st	2nd	3rd	Mean±SD
Control	0.13	0.15	0.14	0.14±0.01
FGF	0.22	0.22	0.23	0.22±0.00
FGF+nicotine 1 µM	0.17	0.14	0.15	0.15±0.01*
FGF+nicotine 10 µM	0.12	0.11	0.13	0.12±0.01*
FGF+nicotine 100 µM	0.11	0.10	0.11	0.11±0.00*

The gingival fibroblasts were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, and cells were dropped using trypsin-EDTA and dispensed into a 96-well polystyrene culture dish at 1×10^3 cells/ml at a concentration of 10 ng/ml was added to the culture medium. Of nicotine was added to the culture medium to remove the existing culture medium. After incubation in a 5% CO₂ incubator for 12 hours, cell growth was examined using MTT. *Statistically significant difference compared with fibroblast growth factor ($P < 0.05$). FGF, fibroblast growth factor.

5. Inhibitory effect of nicotine on cell proliferation

성장인자는 세포증식 및 상처치유 효과를 측정하는 것으로 결과는 Table 3 및 Fig. 7과 같았다. 성장인자만 투여한 군에 비해 니코틴을 투여한 군은 통계적으로 유의하게 세포증식이 감소하였다($P < 0.05$).

고 안

니코틴의 효과와 상피세포에 대한 흡연효과를 다룬 연구가 기술되어 있으나 성장인자와 니코틴의 농도에 관한 효과에 관한 연구는 미비하였다. 니코틴이 구강점막등 상피를 쉽게 통과하고¹²⁾, 면역방어기전을 억제하며¹³⁾, 섬유아세포의 기능을 변경시킨다는 점으로 보아 치주질환의 원인에서 니코틴은 잠재적인 역할을 하는 것으로 보고되었다. 니코틴은 치은에 혈관성 변화를 유도하여 임파구와 HeLa cell에서 DNA합성을 억제하고, 섬유아세포의 형태를 변화시키며 기질에 대한 섬유아세포 부착에 영향을 미치고 단백질 합성과 분비의 장애를 초래한다고 보고되었다¹⁴⁾.

섬유아세포는 창상 치유반응과 정상적인 대사과정에 연관된 치주 결합조직의 중요한 구성요소이다. 치근 면으로 이주하는 세포들 중 치은 섬유아세포는 치은결합조직내에 존재하는 세포의 약 65-85%를 차지하며 방추형 또는 성상형의 형태로 교원질과 탄력소 등의 여러 가지 섬유와 결합조직의 기질을 생성하고 유지함으로써 치주조직의 치유에 관여하고 있다¹⁵⁾. 이러한 세포의 역할을 조절하는 데 성장인자가 중요하게 작용하는데 그중 치주조직의 치유와 재생에 관여하는 성장인자로서 섬유아세포 성장인자(Fibroblast growth factor)가 있다¹⁶⁾. 대식세포는 선천면역과 획득면역에 관여하여 체내의 항상성을 유지하는 세포로 체내에 항원이 침입하게 되면, 식세포 작용으로 항원을 제거하거나 항원을 다른 면역세포에 제시하여 염증 반응이 일어나도록 유도해 항원의 증식을 막는 역할을 담당하고 있다¹⁷⁾. 면역계에서 염증이 나 질병의 감염에 대한 반응으로 사이토카인이라는 물질을 방출하는데 대식세포가 내독소로 잘 알려진 그람 음성균의 세포의 막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)와 반응하면 활성화되어 TNF- α , IL-1 β ,

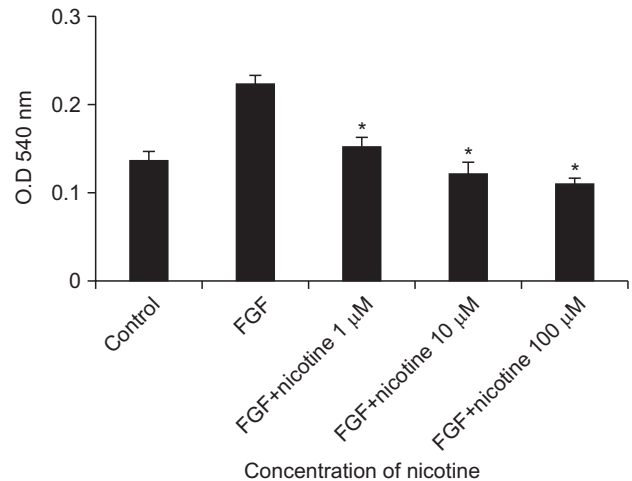


Fig. 7. Inhibitory effect of nicotine on cell proliferation. The gingival fibroblasts were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, and cells were dropped using trypsin-EDTA and dispensed into a 96-well polystyrene culture dish at 1×10^3 cells/ml at a concentration of 10 ng/ml was added to the culture medium. Of nicotine was added to the culture medium to remove the existing culture medium. After incubation in a 5% CO₂ incubator for 12 hours, cell growth was examined using MTT. *Statistically significant difference compared with fibroblast growth factor ($P < 0.05$). FGF, fibroblast growth factor.

IL-6 등과 같은 염증 유발 cytokines를 분비하게 된다¹⁸⁾. 이러한 이유로 염증성 사이토카인을 확인하여 니코틴이 섬유아세포에 어떠한 영향을 주는지 확인해 볼 수 있다.

Chamson 등¹⁹⁾은 섬유아세포내 니코틴의 존재는 교원질 합성과 단백질 분비 같은 정상적인 세포대사과정을 방해하는 것으로 보이며 정상적인 창상 치유반응을 방해하는 것 같다고 보고하였다. 이는 본 연구에서 치은 섬유아세포에 니코틴의 농도에 따라 MTT 처리를 하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 군보다 니코틴 5 mM 처리한 군에서 통계적으로 유의하게 세포의 생존력을 감소시켰고, 니코틴의 농도가 높아질수록 세포의 생존능력이 감소되었던 것과 일치하는 결과이다.

또한 니코틴은 섬유모세포의 정상적인 부착과 형태를 방해한다고 보고되었으며, 세포내로 흡수되는 니코틴은 억제수준농도 이전까지의 농도에서는 세포의 분열 자극이 있다고 주장했다¹⁴⁾. 세포 증식에 대한 효과를 알아본 이전 연구에서는 니코틴이 치은 섬유아세포의 세포증식을 억제한다고 보고되었다²⁰⁾. 이는 본 연구에서 성장인자(FGF)만 투여한 군에 비해 성장인자(FGF)에 니코틴 1, 10, 100 µM 투여시, 농도가 높아질수록 세포증식이 감소함을 나타낸 것과 결과가 유사하였다.

니코틴 함유 제품은 치주조직에 섬유아세포 부착과 유사한 방해를 발생시켜 치주조직에 더 파괴적이고 치주치료 후에도 새로운 부착에 덜 민감하다고 하였다¹⁴⁾. 본 연구의 결과와 비교하여 보았을 때, 치은 섬유아세포에 니코틴 투여 시, 세포의 활성이 감소되어 세포의 증식이 감소하였다. 이를 통해 니코틴이 정상적인 창상 치유를 억제한다고 사료된다. 치주치료 후 재부착과 창상치유에 관해서 기질과 치은 섬유아세포의 부착에 대한 니코틴의 긍정적인 효과를 주장한 연구가 있다. 이 연구에서 낮은 농도의 니코틴에서 치은 섬유아세포는 세

포증식이 현저히 증가된다고 보고하였다²¹⁾. 또한 비흡연자의 치은 섬유아세포군을 이용하여 저농도의 니코틴을 투여 시 치은 섬유아세포의 증식을 보고하였다²²⁾. 이는 본 연구에서 치은 섬유아세포에 대조군 *T. forsythia* LPS와 니코틴을 투여하여 배양한 염증성 사이토카인을 측정하였을 때 염증성 사이토카인 종양괴사인자- α 발현은 대조군 *T. forsythia* LPS에 비해 니코틴 1 μ M와 10 μ M를 투여한 군에서 감소하였고, 염증성 사이토카인 인터루킨-8 발현은 *T. forsythia* LPS에 니코틴 1 μ M와 10 μ M를 투여한 군에서 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타난 것과 일치하는 결과로 이러한 결과는 이외에 세포의 증식 세포 활성화를 낮추고 이에 따라 세포반응을 저해하는 것으로도 사료된다. 따라서 저농도에서 염증성 사이토카인 수치가 낮아진 것은 세포 활성화를 낮추고 세포반응이 저해되어 염증수치가 낮아진 것으로 사료되며, 치주질환과 관련된 치은 섬유아세포에 영향을 주어 상처치유 효과가 낮아짐을 확인할 수 있었다.

이상의 연구결과를 근거로 비록 실험실상 배양에 한정되어 있어 현 실험결과를 임상적으로 적용하기 어려울 수 있으나 니코틴이 치주 조직의 치유에 문제를 야기시킬 수 있다고 추정할 수 있다. 그리고 니코틴의 농도가 높을수록 치유효과가 더딜 것이라고 예상해 볼 수 있다. 결국 흡연에 노출되어 혈중 니코틴 농도가 높아질수록 치주조직에 위해를 줄 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 치은 섬유아세포를 이용한 니코틴의 치은 상처 치유효과를 규명하기 위해 치은 섬유아세포에 0.1, 1, 5, 10 mM 니코틴 농도를 투여하여 세포의 생존 능력을 평가하고, 세포 사멸을 평가하기 위해 치은섬유모세포에 비사멸 농도인 니코틴 0.1 mM에 Annexin V-FITC, 요오드화 프로피디움을 반응시켰다. 또한 염증성 사이토카인의 발현을 측정하기 위해 치은 섬유아세포에 니코틴 1, 10, 100 μ M를 투여하여 Real-time RT-PCR, ELISA 검사를 시행하였고, 저농도인 니코틴 1, 10 μ M에 *E. coli* LPS, *T. forsythia* LPS를 추가 처치하고 Real-time RT-PCR, ELISA 검사를 시행하여 염증성 사이토카인의 발현을 측정하였다. 그리고 FGF에 니코틴 1, 10, 100 μ M를 추가 처치하고 세포의 증식 및 상처 치유를 평가하는 실험실적 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 니코틴의 농도가 높아질수록 치은섬유아세포의 생존능력이 감소하였다.
- 2) 저농도(0.1 mM)의 니코틴을 투여시, 24시간 노출시 치은 섬유아세포의 사멸이 발생하는 것으로 나타났고 48시간 노출시 치은 섬유아세포의 사멸과 괴사가 함께 발생하는 것으로 나타났다.
- 3) 염증성 사이토카인은 Real-time RT-PCR, ELISA 측정시 니코틴의 농도가 높아질수록 높아졌다.
- 4) 염증성 사이토카인이 낮았던 저농도(1, 10 μ M)의 니코틴에 *E. coli* LPS, *T. forsythia* LPS를 추가 처치하였을 때 염증성 사이토카인의 발현을 낮추는 것으로 나타났다.
- 5) 성장인자(FGF)는 니코틴을 투여시, 농도가 높아질수록 세포의 생존능력이 감소함을 나타냈다.

이를 토대로 니코틴의 농도가 높을수록 치은 섬유아세포의 생존능력이 저하되고 염증성 사이토카인 역시 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 저농도의 니코틴은 염증성 사이토카인의 발현을 낮추는 것으로 보였으나, FGF에 니코틴을 투여했을 때 농도가 높아질수록 세포의 생존능력이 낮아지는 것으로 보아 저농도에서 염증성 사이토카인 수치가 낮아진 것은 세포 활성화를 낮추고 세포 반응이 저해되어 염증 수치가 낮아진 것으로 사료되었다. 결국 치주질환과 관련된 치은 섬유아세포에 영향을 주어 상처 치유효과가 낮아짐을 확인할 수 있었다. 따라서 니코틴은 치은 섬유아세포의 증식과 상처 치유를 저해함으로 외과 치료 및 치주치료 후 회복을 위해 금연을 하는 것이 상처 치유에 도움을 줄 것으로 예상된다.

ORCID

Kang-Uk Han, <https://orcid.org/0000-0003-1511-8530>
 Cheon-Hee Lee, <https://orcid.org/0000-0002-3203-8025>
 Joon-Haeng Lee, <https://orcid.org/0000-0002-3575-5476>
 Yeol-Mae Jeon, <https://orcid.org/0000-0002-9700-9137>

References

1. Bonita R, Magnusson R, Bovet P, Zhao D, Malta DC, Geneau R, Suh I, Thankappan KR, McKee M, Hospedales J, de Courten M, Capewell S, Beaglehole R. Country actions to meet UN commitments on non-communicable diseases: a stepwise approach. *Lancet* 2013;381:575-584.
2. Jee SH, Yun JE, Park JY, Sul JW, Kim IS. Smoking and cause of death in Korea: 11 years follow-up prospective study. *Korean J Epidemiol* 2005;27:182-190.
3. Yun YH, Jung KW, Bae JM, Lee JS, Shin SA, Park SM, Yoo TW, Huh BY. Cigarette smoking and cancer incidence risk in adult men: National Health Insurance Corporation Study. *Cancer Detect Prev* 2005;29:15-24.
4. Hayes RB, Bravo-Otero E, Kleinman DV, Brown LM, Fraumeni JF Jr, Harty LC, Winn DM. Tobacco and alcohol use and oral cancer in Puerto Rico. *Cancer Causes Control* 1999;10:27-33.
5. Paik DI, Kim HD, Shin SC, Cho JW, Park YD, Kim DK, et al. *Clinical Preventive Dentistry*. 5th ed. Seoul:Koomoon:2011:431-442.
6. Baab DA, Oberg PA. The effect of cigarette smoking on gingival blood flow in humans. *J Clin Periodontol* 1987;14:418-424.
7. Kye SB, Han SB. Effects of cigarette smoking on periodontal status. *J Korean Acad Periodontol* 2001;31:803-810.
8. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004;75:196-209.
9. Millar WJ, Locker D. Smoking and oral health status. *J Can Dent Assoc* 2007;73:155.
10. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73:1059-1065.
11. Hwang CH, Park MY, Park KK, Choi SH, Cho KS, Kim CK, Chai JK. The Effects of Nicotine and NNK on gingival fibroblast. *J Korean Acad Periodontol* 1998;28:703-721.
12. Copeland RL Jr, Das JR, Kanaan YM, Taylor RE, Tizabi Y. Antiapoptotic effects of nicotine in its protection against salsolinol-induced cytotoxicity. *Neurotox Res* 2007;12:61-69.
13. Holt PG, Keast D. Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experi-

- mental animals. *Bacteriol Rev* 1977;41:205-216.
14. Raulin LA, McPherson JC, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J Periodontol* 1988;59:318-325.
15. Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* 1990;61:103-111.
16. Caffesse RG, Quiñones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000 1993;1:69-79.
17. Lee TJ, Kwak HB, Kim HH, Lee ZH, Chung DK, Baek NI, Kim JY. Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappaB transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells* 2007;23:398-404.
18. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
19. Chamson A, Frey J, Hivert M. Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell cultures. *J Toxicol Environ Health* 1982;9:921-932.
20. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66:1056-1064.
21. Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O'Neal RB, Strong SL, Van Dyke TE. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1993;64:658-665.
22. Checchi L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effects of nicotine and age on replication and viability of human gingival fibroblasts in vitro. *J Clin Periodontol* 1999;26:636-642.