

니코틴이 배양인체 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 효과

공영환 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

흡연은 수많은 질환을 유발할수 있고, 인류의 건강을 위협할수 있는 매우 다양한 효과를 가진 잠재적인 위험요인이다. 예를 들면 심맥관계 질환, 뇌혈관계 질환, 위장관계 질환등이 대부분 흡연과 연관이 있다. 더불어 만성 치주 질환이 흡연과 연관되어 있다는 증거가 축적¹⁻⁴⁾ 되고 있지만 아직까지도 논쟁의 여지가 많이 남아있다. 그러나 대부분의 임상가는 담배의 사용과 치주질환의 증가하는 빈도와 심도 사이에는 강한 긍정적인 상관관계가 있다고 주장하였다⁵⁻⁷⁾. 반면 다른 연구^{8,9)}에서는 비흡연가와 흡연가 사이의 치주질환의 정도가 차이가 없다고 보고하였다. 또한 치주질환의 직접적인 원인이 되는 치태와 치석의 침착이 비흡연가에서 보다 흡연가에서 증가한다는 주장^{8,10,11)}이 있는가 하면 오히려 치태축적의 감소를 보고한 결과도 있다¹²⁻¹⁴⁾. 일반적으로 흡연가는 많은 양의 치석침착을 위한 핵으로 작용하는 높은 빈도의 staining을 가지고 있다.

흡연과 치주질환과의 관계에 대한 최근의 연구¹⁵⁾는, 둘 사이에 뚜렷한 상관관계가 있다는 것을 명백히 보여주고 있다. 또한 이 연구에서는 현재 흡연중인 사람이, 이전에 흡연을 했던 사람 즉, 현재는 흡연을 하지 않은 사람에 비교해 치주질환의 빈도 및 심도가 증가한다고 보고하고 있다.

임상적인 증상으로서 흡연가와 비흡연가 사이에는, 흡연가에서 치주질환의 심도에 비해

최소한의 치은발적과 부종, 전치부와 구치부 설측면으로 깊은 치주낭이 형성, 전치부의 치은퇴축등이 나타난다고 보고된 바있다¹⁶⁾.

창상의 치유면에서는, 흡연이 치주판막술후¹⁷⁾, 구강외과 술식후¹⁸⁾, 조직 이식술후¹⁹⁾ 창상의 치유를 불량하게 한다고 보고되었다.

이와 같이 많은 증거가 흡연과 치주건강 사이의 해로운 관계를 주장하는 반면 담배의 구성요소와 치주치료후의 조직반응 사이의 관계에 대한 본질적인 특성은 아직도 불투명하게 남아 있다. 담배는 니코틴, nitrous amine과 다양한 물질로 구성된 복잡한 혼합물이다. 이러한 물질의 세포성 반응은 매우 다양하고, 담배의 특정 요소와 이런 요소들의 양과 연관되어 있다.

예를 들면 흡연은 구강내 중성구의 생존 능력을 감소 시키고, 대식작용과 화학주성 능력 또는 감소 시키며²⁰⁻²²⁾ 부가적으로 비만 세포의 degranulation이 자극을 받는다고 하였다²³⁾. 그리고 임파구의 생존력이 감소하며 임파구 증상이 억제 되며²⁴⁾, 항체 생성이 감소된다고 하였다²⁴⁾. Fang등²⁵⁾은 니코틴이 세포의 성장을 억제하고, 쥐의 골아세포 유사세포에서 Alkaline phosphatase 활성을 자극한다고 보고했다.

Hanes등²⁶⁾은 니코틴이 치은에 혈관성 변화를 유도하며 실험실상 임파구와 HeLa cell에서 DNA합성을 억제한다고 했으며, 섬유모세포의 형태를 변화시키며 기질에 대한 섬유모세포 부착에 영향을 미치고 단백질 합성과 분비의 장애를 초래한다고 보고했다.

현재 치주치료의 목적이 단순한 치주낭의 제거가 아닌, 치주조직의 재생이라는 개념에 근거하면 치근면과 결체조직의 부착은 이러한 치주치료의 목적을 달성하는데 필수적일 것이다. 그러나 흡연가에서 혈중 니코틴의 존재하에 치은섬유모세포 및 치주인대 세포가 어떤 영향을 받는지에 대한 결과가 보고된바 있다²⁶⁾. 이 연구에 의하면 니코틴이 치은섬유모세포에 결합은 하지만 비특이적이라 하였고, 4시간 이상 니코틴을 섭취하면 정상적인 치은섬유모세포의 기능을 방해할수 있는 고농도의 니코틴 혈장농도를 유지한다고 했다. 흡연과 연관된 이러한 많은 원하지 않던 효과들은 바로 니코틴 때문이다.

따라서 이 연구의 목적은, 니코틴이 담배의 주요 구성요소이기 때문에, 치은 섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 니코틴이 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위한 것이며 만약 니코틴이 치주조직의 재생에서 필수적인 섬유모세포의 부착에 영향이 있다면 그것을 결정하기 위함이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 니코틴의 준비

니코틴의 다른 화합물에 의한 영향을 배제하기 위해 순도 98% 이상의 순수한 니코틴 용액 (Sigma Chemical Company, USA)을 준비했다. 일반적인 흡연가, 즉 하루에 담배 1갑을 피우는 사람의 평균 니코틴의 혈장농도가 0.1 μM 이고 경미한 흡연가, 즉 하루에 담배 1-2 개비를 피우는 사람의 평균 니코틴 혈장농도가 0.025 μM 이기 때문에³⁵⁾ 본 실험에서는 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μM 의 농도로 준비했다.

2) 치은섬유모세포 및 치주인대 세포의 배양

본 연구에 사용된 치은섬유모세포 및 치주인대 세포는 교정 목적으로 발치한 소구치나 제3대구치에서 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선학적으로 평가 되

었다. 발치한 치아로부터 절제한 치은조직과, 치근의 중간 1/3에서 절제한 치주인대조직은 40% 우태아 혈청(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 20% 항생제(Penicillin G, Streptomycin, Amphotericin B 포함, Gibco Co., USA)를 가한 α -MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)로 3회 세척하였다. 치은 및 치주인대 조직을 세척한후 60mm 세포배양을 배양접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다. 세절한 조직은 20분간 37°C 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Bantex 1820 IR, SHELLLAB, USA)에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 포함한 α -MEM을 가하고 단일세포층이 형성될때까지 3일 간격으로 배양액을 교환 하였다.

3일간 배양후 배양접시내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, Gibco Co., USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한후 0.25% Trypsin/EDTA(10%, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고 3분간 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200rpm으로 10분간 원침하였다. 원침후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한후 Vortex mixer로 혼합하고 세포 부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날때까지 2 혹은 3일 간격으로 교환 하였다. 본 실험에서는 4회 내지 5회 계대 배양한 치은섬유모세포 및 치주인대 세포를 이용하였다.

2. 연구방법

1) 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 부착도 평가

각 실험에 앞서 24well plate에 well당 세포가 20,000개가 되도록 분주하기 위해 trypan-blue로 염색한후 hemocytometer에 옮겨 도립현미경 상에서 세포수를 세어 부착이 되도록 분주시에 nicotin 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μM 을 동시에 투여하고 10분, 30분, 60분, 90분간 배양후 도립 현미경(IMT-2-21, Olympus, Japan)

을 이용하여 세포의 형태를 관찰하고 각군의 세포부착도를 보기 위해 식염수에 용해한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 μ l를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양후 MTT 용액을 버리고, DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해 시킨후 세포 활성도의 측정을 위해 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)를 이용하여 부착되어 있는 세포의 활성도를 평가해 부착정도를 간접적으로 평가했다.

2) 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

실험 전일 24well plate에 분주한 치은 섬유모세포와 치주인대 세포에 nicotine을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ M의 농도로 가한 군으로 나누어 24시간, 48시간, 72시간동안 배양하였다.

각군의 세포활성을 보기 위해 식염수에 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 μ l를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양후 MTT 용액을 버리고, DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해 시킨후 세포 활성도의 측정을 위해 96well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣은 다음 630nm를 기준으로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 군마다 4배수로 시행하였으며, 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 모든 실험결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출하였다.

$$\text{세포활성도}(\%) = \frac{\text{실험 well의 흡광도}}{\text{대조군 well의 흡광도}} \times 100$$

3) 통계분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성의 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적인 유의성은 일원분산

분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석하였다.

III. 연구 결과

1. 니코틴이 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 부착에 미치는 영향

니코틴 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 10, 20 μ M을 치은섬유모세포와 치주인대 세포에 각각 10, 30, 60, 90분간 가하였을때 각각 다음과 같은 결과가 나타났다.

치은섬유모세포군에서, 니코틴을 10분간 처리했을때 0.2 μ M에서 대조군의 최고 154.10 \pm 7.59의 세포부착도를 보였으며 0.4 μ M을 제외하고, 전군에서 통계학적으로 유의성이 있게 대조군 수준을 훨씬 넘는 세포의 부착도를 보였다. 30분 처리군에서는 0.1 μ M에서 대조군의 최고 124.04 \pm 2.43의 세포부착도를 보였으며 0.025, 0.1 μ M에서 통계적으로 유의성이 있게 높은 부착도를 보였다. 60분 처리군에서는 0.4 μ M을 제외하고는 전군에서 대조군 수준보다 높은 부착도를 보였는데 대조군과 0.1 μ M에서만 통계적으로 유의성이 나타났다. 90분 처리군에서는 점차 대조군의 수준으로 돌아오는 양상을 보였다(Table 1).

치주인대세포군에서, 니코틴을 10분간 처리하였을때는 농도별로 각각 84.65 \pm 8.37, 85.43 \pm 6.45, 85.27 \pm 3.50, 82.48 \pm 9.95, 59.69 \pm 1.62로 전군 모두 대조군에 미치지 못하는 세포의 부착도를 보였다. 30분간 처리하였을때는 각각 104.10 \pm 9.92, 105.17 \pm 3.92, 105.35 \pm 1.61, 118.31 \pm 9.90, 98.40 \pm 6.85로 10분 처리군에 비해 점차 대조군 수준으로 회복되는 양상을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 60분간을 처리하였을때는 각각 98.28 \pm 3.79, 95.31 \pm 4.48, 109.39 \pm 4.90, 94.37 \pm 2.93, 95.31 \pm 1.27의 활성도를 보였다. 90분 처리시는 각각 111.32 \pm 9.10, 106.29 \pm 9.57, 89.62 \pm 3.43, 104.88 \pm 4.83, 106.45 \pm 3.09의 활성도를 보였다(Table 2).

Table 1. Cell attachment of gingival fibroblast after nicotine 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4mM application(By MTT Assay)

	10 min	30 min	60 min	90 min
Control	100.00 ± 6.35 ¶	100.00 ± 9.24 †	100.00 ± 1.99 †	100.00 ± 1.78
0.025 µM	132.64 ± 3.61 ¶	131.21 ± 3.43 †	110.13 ± 3.33	102.99 ± 4.49
0.05 µM	138.43 ± 2.57 ¶	103.19 ± 1.55	99.95 ± 7.46	94.93 ± 4.30
0.1 µM	134.21 ± 3.71 ¶	124.04 ± 2.43 †	122.33 ± 2.82 †	97.19 ± 4.47
0.2 µM	154.10 ± 7.59 ¶	122.05 ± 8.21	108.39 ± 7.17	96.56 ± 4.12
0.4 µM	97.21 ± 8.98	97.34 ± 4.01	90.94 ± 6.44	96.38 ± 5.60

Mean ± S.D

¶, †, ‡ : Statistically different from control group (P < 0.05)

Table 2. Cell attachment of periodontal ligament cells after nicotine 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4µM application(By MTT Assay)

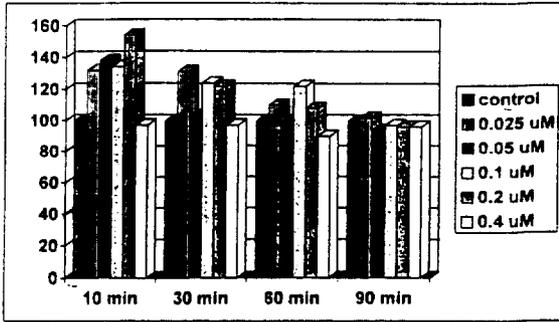
	10 min	30 min	60 min	90 min
Control	100.00 ± 1.04	100.00 ± 9.24	100.00 ± 5.51	100.00 ± 9.79
0.025 µM	84.65 ± 8.37	104.10 ± 9.92	98.28 ± 3.79	111.32 ± 9.10
0.05 µM	85.43 ± 6.45	105.17 ± 3.92	95.31 ± 4.48	106.29 ± 9.57
0.1 µM	85.27 ± 3.50	105.35 ± 1.61	109.39 ± 4.90	89.62 ± 3.43
0.2 µM	82.48 ± 9.95	118.31 ± 9.90	94.37 ± 2.93	104.88 ± 4.83
0.4 µM	59.69 ± 1.62	98.40 ± 6.85	95.31 ± 1.27	106.45 ± 3.09

Mean ± S.D

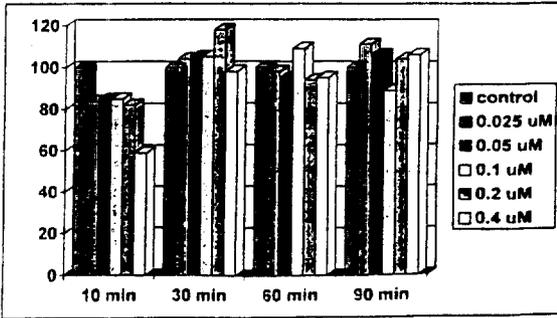
2. 니코틴이 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성에 미치는 영향

니코틴을 0.025µM로 가한 경우 배양 1일째, 치은섬유모세포의 활성은 95.78 ± 3.64였고 치

주인대세포의 활성은 104.32 ± 2.10이었다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포의 활성이 101.65 ± 6.32였고 치주인대 세포의 활성이 111.50 ± 7.16이었다. 배양 3일째는 치은섬유모세포의 활성이



(A)



(B)

Fig 1. Cell attachment of gingival fibroblasts & periodontal ligament cells
 A : Gingival fibroblasts
 B : periodontal ligament cells

97.27 ± 2.31이었고 치주인대세포의 활성은 88.09 ± 5.28이었다.

니코틴을 0.05μM로 가한 경우 배양 1일째, 치은섬유모세포의 활성은 84.99 ± 5.19였고 치주인대세포의 활성은 111.21 ± 4.57이었다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포의 활성이 112.28 ± 1.15였고 치주인대 세포의 활성이 115.65 ± 2.63이었다. 배양 3일째에는 치은섬유모세포의 활성이 95.37 ± 3.09였고 치주인대세포의 활성은 92.06 ± 1.09였다.

니코틴을 0.1μM로 가한 경우 배양 1일째, 치은섬유모세포의 활성은 86.01 ± 4.80이었고 치주인대세포의 활성은 108.33 ± 7.02였다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포의 활성이 125.83 ± 3.85였고 치주인대세포의 활성이 117.89 ± 5.56이

었다. 배양 3일째에는 치은섬유모세포의 활성이 89.06 ± 2.98이었고 치주인대세포의 활성은 89.17 ± 2.23이었다.

니코틴을 0.2μM로 가한 경우 배양 1일째, 치은섬유모세포의 활성은 83.46 ± 6.94였고 치주인대세포의 활성은 98.12 ± 4.00이었다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포의 활성이 117.14 ± 2.82였고 치주인대세포의 활성이 96.53 ± 6.29이었다. 배양 3일째에는 치은섬유모세포의 활성이 96.25 ± 1.97이었고 치주인대세포의 활성은 85.17 ± 3.13이었다.

니코틴을 0.4μM로 가한 경우 배양 1일째, 치은섬유모세포의 활성은 90.43 ± 7.63이었고 치주인대세포의 활성은 96.30 ± 5.96이었다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포의 활성이 110.02 ± 3.87이었고 치주인대 세포의 활성이 110.84 ± 6.04였다. 배양 3일째에는 치은섬유모세포의 활성이 92.02 ± 1.87이었고 치주인대세포의 활성은 82.07 ± 5.63이었다.

결과적으로 배양 1일째에는 치은섬유모세포 및 치주인대세포군 모두 전 농도에서 대조군과 비슷하거나 오히려 감소한 세포의 활성도를 보였으며, 배양 2일째에는 치은섬유 모세포군에서 대조군과 0.05, 0.1, 0.2, 0.4μM의 농도에서 통계적으로 유의성이 있는 세포활성의 증가를 가져왔다. 그러나 배양 3일째에는 치은섬유모 세포 및 치주인대세포의 모든 군에서 대조군 수준에 훨씬 못미치는 세포의 활성도를 보였다 (Table 3), (Fig 2).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환에 의해 야기되는 상실된 치주조직의 재생에서, 치근면으로의 세포 부착능력은 매우 중요하다. 실제로 치주치료의 궁극적인 목적은 치근면에서 상실된 결합조직 부착의 재확립이다.

니코틴의 효과와 상피세포에 대한 흡연효과에 관한 다양한 연구가 기술되어 있으나^{27, 28, 29, 30} 결합조직요소, 즉 치은섬유모세포 및 치주인대세포에 대한 니코틴의 효과는 아직 불명확

Table 3. Cellular activities of nicotine application on gingival fibroblast & periodontal ligament cells after 1st day, 2nd day & 3rd day.(By MTT Assay)

	GF			PDL		
	1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
control	100.00 ± 1.90	100.00 ± 4.68	100.00 ± 2.59	100.00 ± 1.84	100.00 ± 1.67	100.00 ± 3.71 †
0.025 μM	95.78 ± 3.64	101.65 ± 6.32	97.27 ± 2.31	104.32 ± 2.10	111.59 ± 7.16	88.08 ± 5.28
0.05 μM	84.99 ± 5.19	112.28 ± 1.15	95.37 ± 3.09	111.21 ± 4.57	115.65 ± 2.63	92.06 ± 1.09
0.1 μM	86.01 ± 4.80	125.83 ± 3.85	89.06 ± 2.98	108.33 ± 7.02	117.89 ± 5.56	89.17 ± 2.23
0.2 μM	83.46 ± 6.94	117.14 ± 2.82	96.25 ± 1.97	98.12 ± 4.10	96.53 ± 6.29	85.17 ± 3.13 †
0.4 μM	90.43 ± 7.63	110.02 ± 3.87	92.02 ± 1.87	96.30 ± 5.96	110.84 ± 6.04	82.07 ± 5.63 †

Mean ± S.D

GF : Gingival fibroblast

PDL : Periodontal ligament cells

† : Statistically different from control group (P < 0.05)

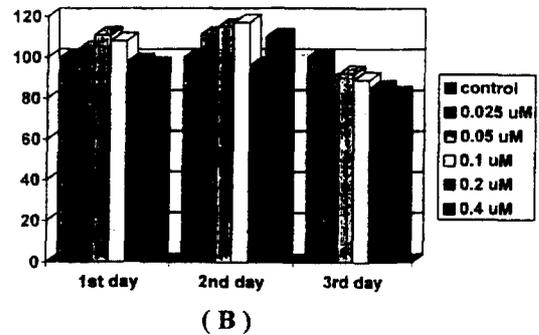
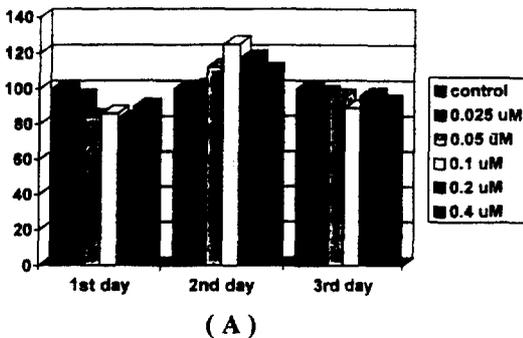


Fig 2. Cellular activities of gingival fibroblasts & periodontal ligament cells

A : Gingival fibroblasts

B : periodontal ligament cells

하게 남아 있다. 그러나 니코틴이 피부와 구강점막등³¹⁾ 상피를 쉽게 통과 한다는 사실과 면역 방어기전을 억제한다는 사실^{20, 24, 32)}, 그리고 실험실상 섬유모세포의 기능을 변경시킨다는

점^{33, 34)}으로 미루어 보아 치주질환의 원인에서 니코틴의 잠재적인 역할은 분명하다. Hanes 등²⁶⁾은 니코틴이 치은에 혈관성 변화를 유도하며 실험실상 임파구와 HeLa cell에서 DNA 합성을

억제한다고 했으며, 섬유모세포의 형태를 변화시키며 기질에 대한 섬유모세포 부착에 영향을 미치고 단백질 합성과 분비의 장애를 초래한다고 보고했다.

섬유모세포는 창상 치유반응과 정상적인 대사과정 둘다에 연관된 치주결합조직의 중요한 구성요소이다.

치주치치후 재부착과 창상치유에 관해서 기질에 대한 치은섬유모세포의 부착에 대한 니코틴의 긍정적인 효과를 주장한 연구³⁵⁾가 있다. 반면, Chamson등³³⁾은 섬유모세포내 니코틴의 존재는 교원질 합성과 단백질 분비 같은 정상적인 세포 대사과정을 방해하는것 같아 보이며 정상적인 창상 치유반응을 방해하는 것 같다고 보고했다. Raulin등³⁴⁾은 니코틴이 기질로의 섬유모세포의 정상적인 부착과 형태를 방해한다고 보고했다.

본 연구에 사용된 니코틴의 농도는 일반적인 흡연가, 즉 하루에 담배 1갑을 피우는 사람이 평균 니코틴 혈장농도가 $0.1\mu\text{M}$ 이며, 아주 경미한 흡연가, 즉 하루에 1-2개비를 피우는 사람의 평균 혈장농도가 $0.025\mu\text{M}$ 이므로 이를 기준으로 하였다.

니코틴이 치은섬유모세포와 치주인대세포의 부착 및 활성화에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 행한 본 연구에서, 부착도에 미치는 영향은 치은섬유모세포의 경우 니코틴의 10분 처리군에서 $0.4\mu\text{M}$ 의 고농도를 제외하고는, 전군에서 세포활성의 증가를 보였다. 그러나 이러한 결과는 시간이 경과할수록 점차 대조군 수준으로 회복되는 양상을 보였다. 또한 농도가 높아질수록 $0.4\mu\text{M}$ 을 제외하고는 농도의존형으로 세포의 부착을 증가시켰으나 시간이 경과할수록 대조군 수준으로 회귀되는 양상을 보였다.

치주인대세포의 경우 10분 처리군에서는 대조군에 비해 감소된 부착도를 보였고 30분에서 90분 처리군은 대조군에 비해 유의한 세포의 부착을 보이지 않았고 전 기간에 걸쳐 대조군 수준과 유사한 세포의 부착도를 보여 주었다.

이는 Peacock등³⁵⁾의 다양한 농도의 니코틴의 노출에 따른 부착되는 섬유모세포의 수는 시

간이 지남에 따라 일반적으로 증가한다는 결과와는 상이하다. 그러나 섬유모세포내 니코틴의 존재는 교원질 합성과 단백질 분비 같은 정상적인 세포 대사과정을 방해하는것 같아 보이며 정상적인 창상 치유 반응을 방해하는 것 같다고 보고한 Chamson등³³⁾의 결과와, 니코틴이 섬유모세포의 정상적인 부착과 형태를 방해한다고 보고한 Raulin등³⁴⁾의 결과와는 일치한다.

또한 Raulin등³⁴⁾의 세포내로 흡수되는 니코틴은 억제수준의 농도가 있으며 이 농도 이전까지의 농도에서는 세포의 분열 자극이 있다고 주장했다. 본 연구에서 치은섬유모세포군에서 초기에 세포의 부착도가 높은것은 이러한 이유때문일 것이라고 사료된다. 치주인대 세포군에서는 이러한 실험실적 연구가 없었다. 본 연구에서 나타난 결과는 치은섬유모세포 및 치주인대 세포의 성장 및 특징이 서로 다르기 때문으로 사료된다.

치은섬유모세포와 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향을 치은섬유모세포군에서, 배양 1일째에는 대조군 수준보다 감소되었거나 유사한 수준을 보인 반면 배양 2일째에는 $0.025\mu\text{M}$ 농도를 제외하고는 세포의 활성화도가 높아진것을 볼수 있었다. 그러나 신부착에 있어 가장 중요시 생각되는 치주인대 세포군에서는 배양 1일과 2일 모두에서 통계학적인 유의성이 없이 대조군 수준과 유사한 수준을 보여주었다. 또한 배양 3일째에는 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 모든 군에서 대조군 수준에 훨씬 못미치는 세포의 활성도를 보여 주었다.

이상의 연구결과를 근거로, 흡연이 국소적, 전신적인 요소 모두에 해롭게 영향을 주며 치주건강에 위대한 효과를 준다는 것이 명백해졌다.

국소적인 영향들은 니코틴을 포함한 담배내의 cytotoxic & vasoactive 한 물질에 의해 증대될수 있다³⁶⁾. 숙주면역과 염증성 반응들에 대한 흡연의 전신적 영향들은 말초혈액과 중성구 기능의 억제^{20, 22, 36, 37)}, 감소된 항체형성^{38, 39)}, 그리고 T cell의 변화^{40, 41)}를 포함한다. 또한 흡연자들은 감소된 bone mineral을 가지고 있다고 보고^{42, 43)}

된 것처럼 흡연은 bone에도 영향을 미친다.

따라서 가지각색인 숙주 기능에 대한 흡연의 영향들과, 흡연과 연관된 치주염에 대한 높은 위험성에 대한 기전을 확립하는데 더 많은 연구들이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

치은 섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 니코틴이 어떤 영향을 미치는가를 알아 보며, 만약 니코틴이 치주조직의 재생에서 필수적인 섬유모세포의 부착에 영향이 있다면 그것을 결정하기 위해 행한 본 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 니코틴이 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 부착에 미치는 영향

치은섬유모세포와 치주인대세포의 각군 모두 시간이 경과할수록 점차 대조군 수준으로 회복되는 양상을 보였다. 또한 10분군의 치은섬유모세포에서는 농도가 높아질수록 0.4 μ M을 제외하고는 농도의 의존형으로 세포의 부착을 증가시켰으나 시간이 경과할수록 대조군 수준으로 회귀되는 양상을 보였다. 특히 치주인대세포군에서는 전 기간에 걸쳐 대조군 수준과 유사한 세포의 부착도를 보여 주었다(Fig. 1).

2. 니코틴이 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

배양 1일째에는 치은섬유모세포 및 치주인대세포군 모두 전 농도에서 대조군과 비슷하거나 오히려 감소한 세포의 활성도를 보였으며, 배양 2일째에는 치은섬유모세포군에서 대조군과 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ M의 농도에서 통계적으로 유의성이 있는 세포활성의 증가를 가져왔다. 그러나 배양 3일째에는 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 모든 군에서 대조군 수준에 훨씬 못 미치는 세포의 활성도를 보였다(Fig. 2).

이상과 같은 연구결과를 바탕으로 니코틴은 치주조직의 재생에 필수적인 섬유모세포의 부착에 어떠한 영향도 못 미치는 것을 알 수 있었고, 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에도 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Preber H, Bergstrom J. : Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scan J Dent Res*, 94 : 102-108, 1986.
2. Bergstrom J, Floderus-Myrhed B. : Co-twin study on the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol*. 11 : 113-116, 1983.
3. Bergstrom J, Ellasson S. : Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res*. 22 : 513-517, 1987.
4. Rivera-Hidalgo F. : Smoking and periodontal disease. A review of the literature. *J Periodontol*. 57 : 617-624, 1986.
5. Summers CJ, Oberman A : Association of oral disease with 12 variables : I. Periodontal disease. *J Dent Res*, 47 : 457-462, 1968.
6. Ismail AI, Morrison EC, Burt BA, Caffese RG, Kawanagh MT. : Natural history of periodontal disease in adults : Findings from the Tecumesh Periodontal Disease Study, 1959-89. *J Dent Res*, 69 : 430-435, 1990.
7. Bergstrom J. : Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *Comm Dent Oral Epidemiol*, 17 : 245-247, 1989.
8. Sheiham, A. : Periodontal disease and oral cleanliness in tobacco smokers. *J Periodontol* 42 : 259-263, 1971.
9. Lilienthal, B., Amerena, V., and Gregory, G. : An epidemiological study of chronic periodontal disease. *Arch Oral Biol* 10 : 553, 1965.
10. Brandtzaeg P, Jamison HC. : A study of periodontal health and oral hygiene in Norwegian army recruits. *J Periodontol* 35 : 302-307, 1964.

11. Krstoffesen T. : Periodontal conditions in Norwegian soldiers : An epidemiological and experimental study. *Scan J Dent Res* 78 : 34–53, 1970.
12. Alexander AG. : The relationship between tobacco smoking, calculus, and plaque accumulation and gingivitis. *Dent Health* 9 : 6–9, 1970.
13. Bastiaan RJ, Waite IM. : Effects of tobacco smoke on plaque development and gingivitis. *J Periodontol* 49 : 480–482, 1978.
14. Feldmen RS, Bravacos JS, Rose CL. : Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol* 54 : 481–488, 1983.
15. Jerome Haber. : Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Current Opinion in Periodontology*, 12–18, 1994.
16. Haber J, Kent RL. : Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol* 63 : 100–106, 1992.
17. Preber H, Bergstrom J. : Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Clin Periodontol* 17 : 324–328, 1990.
18. Sweet JB, Butler DP. : The relationship of smoking to localized osteitis. *J Oral Surg* 37 : 732–735, 1979.
19. Goldminz D, Bennett RG. : Cigarette smoking and flap and full-thickness graft necrosis. *Arch Dermatol* 127 : 1012–1015, 1991.
20. Kenny EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. : The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 12 : 227–234, 1977.
21. Bridges RB, Hsidh L. : Effect of cigarette smoke fractions on the chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes. *J Leuko Biol* 40 : 73–85, 1986.
22. Kraal JH, Chancellor MB, Bridges RB. : Variations in the gingival polymorphonuclear leukocyte migration rate induced by tobacco smoke. *J Periodont Res* 12 : 242–249, 1977.
23. Holt PG, Bartholomaeus WN, Keast D. : Differential toxicity of tobacco smoking to various cell types including those of the immune system. *Austral J Experiment Biol Med Sci* 56 : 211–214, 1974.
24. Holt PG, Keast D. : Environmentally induced changes in immunological function : Acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminations in man and experimental animals. *Bacteriol Rev* 41 : 205–216, 1977.
25. Fang MA, Frost PJ, Ilda-Klein A, Hahn TJ. : Effects of nicotine on cellular function in UMR 106–01 osteoblast-like cells. *Bone* 12 : 283–285, 1991.
26. Philip J. Hanes, George S. Schuster, and Scott Lubas : Binding, Uptake, and Release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 62 : 147–152, 1991.
27. Schuller HM. : Cell type specific, receptor-mediated modulation of growth kinetics in human lung cancer cell lines by nicotine and tobacco-rebacco-related nitrosamines. *Biochem Pharmacol* 38 : 3439–3442, 1989.
28. Sankaranarayanan R, Duffy SW, Padmakumary G, Day NE, Padmanabhan TK. : Tobacco chewing, alcohol and nasal snuff in cancer of the gingiva in Karala, India. *Br J cancer* 60 : 638–643, 1989.
29. Merletti F, Boffeta P, Ciccone G, Mashberg A, Terracini B. : Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology fo cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino. Italy. *Cancer Res* 49 : 4919–4924, 1989.
30. Trichopoulos D, Katsouyanni K. : Oral contraceptives, tobacco smoking, and breast

- cancer risk. *lancet* 2(8655) : 158–159, 1989.
31. Taylor P. : Ganglionic stimulation and blocking agents. In : Goodman LS, Gilman A, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed. New York : Macmillan Company : 218, 1985.
 32. Warr GA, Martin RR. : Response of human pulmonary macrophages to migration inhibition factor. *Am Rev Respir Dis* 108 : 371–373, 1973.
 33. Chamson A, Frey J, Hivert M. : Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell cultures. *J Toxicol Environ Health* 9 : 921–932, 1982.
 34. 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* 59 : 318–325, 1988.
 35. Peacoak ME, Suthurland DE, Schuster GS, Brennan WA, Robert B, Scott L, and Thomas E. Van Dyke. : The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J periodontol* 64 : 658–665, 1993.
 36. Eichel B, Shahrik HA. : Tobacco smoke toxicity : Loss of human oral leukocyte function and fluid cell metabolism. *Science* 166 : 1424–1426, 1969.
 37. Noble RC, Penny BB. : Comparison of leukocyte count and function in smoking and nonsmoking young men. *Infect Immun* 12 : 550–555, 1975.
 38. Finklefeaf JF, Hasselbald V, Riggan WB, et al. : Cigarette smoking and hemagglutination inhibition response to influenza after natural disease and immunization. *Am Rev Respir Dis* 104 : 368–376, 1971.
 39. Bennet KR, Read PC. : Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers, and patients with minor aphthous ulceration. *J Oral Surg* 53 : 461–465, 1982.
 40. Ginns LC, Goldenheim PD, Miller LG, et al. : T-Lymphocyte subsets in smoking and lung cancer. *Am Rev Resp Dis* 126 : 265–269, 1982.
 41. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Ruhle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers : A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 90 : 39–44, 1986.
 42. Rundgren A, Mellstrom D. : The effect of tobacco smoke on the bone mineral content of the aging skeleton. *Mech Aging Dev* 28 : 273–277, 1984.
 43. Daniell WH. : Osteoporosis of the slender smoker. *Arch Intern Med* 136 : 298–304, 1976.

THE EFFECTS OF NICOTINE ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST & PERIODONTAL LIGAMENT CELLS IN VITRO

Young-Hwan Kong, Hyung-Keun Yoo, Hyung-Shik Shin
Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The ability of fibroblasts attach to teeth is of paramount importance in re-establishing the lost connective tissue attachment after periodontal therapy. Tobacco contains a complex mixture of substances including nicotine, various nitrosamines, trace elements, and a variety of poorly characterized substances. The effects of nicotine on fibroblasts have reported an altered morphology and attachment of fibroblasts to substrates and disturbances in protein synthesis and secretion. This study examined the effect of nicotine, a major component of the particulate phase of tobacco smoke, on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells attachment to tissue culture surfaces and cellular activity of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. Pooled human gingival fibroblasts made from extraction of 3rd molar were utilized between passage 4 and 5 and plated in 96 well plate at 20,000 cells per well. Cell number were determined using 3-(4,5-dimethylthiazole-2-y)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), which is reflection of mitochondrial dehydrogenase activity. The concentration of nicotine used were 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 μ M, the average serum concentration for a smoker being approximately 0.1 μ M.

The results were as follows :

1. Attachment effects of nicotine on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells

Excepts of 0.4 μ M, the effects on attachment with increasing numbers of cells attaching with increasing nicotine concentrations, compared to control group. But over the 60 min, return to control value.

2. The effect of cellular activity on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells

The cellular activity of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells were similar or decrease to control value at 1st incubation day. At 2nd incubation day, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ M concentrations were statistically different from control value on gingival fibroblasts group. But at 3rd incubation day, cellular activities of all experimental group were significantly decrease than control group.