

니코틴이 치은섬유아세포의 세포주기 조절 단백질 발현에 미치는 영향

김탁¹ · 김재호¹ · 피성희¹ · 김은철² · 유용욱³ · 유형근¹ · 신형식¹

¹원광대학교 치과대학 치주과학교실, ²구강병리학교실, ³구강생화학교실

1. 서론

치주질환의 병인에 있어 담배의 역할이 명확히 규명되지는 않았으나 많은 임상가들은 흡연이 치주질환의 발병율과 심도 증가 사이에 강한 상관관계가 있으리라고 믿고 있다^{1,2)}. 최근의 연구들은 실제로 흡연과 치주조직의 파괴^{3,4)}, 치조골 소실^{5,6)}, 치주치료에 대한 반응⁷⁻⁹⁾ 사이에 명확한 연관성을 보고하고 있다. 즉, 흡연 습관이 치주치료 후 회복 정도를 낮추고, 비외과적 치료뿐만 아니라 외과적 치주 치료 후의 회복 정도에도 악영향을 끼친다는 증거들이 있다. 흡연은 또한 골다공증¹⁰⁾, HIV (human immunodeficiency virus) 감염 환자에 대한 심한 치주염¹¹⁾, 조기 발현형 치주염 환자에서 치아의 상실과 진행성 치주부착 소실¹²⁾, 심장 질환¹³⁾, 당뇨병에서의 치주 질환¹⁴⁾, 치근 우식증¹⁵⁾, 백반증¹⁶⁾, 구강암¹⁷⁾, 그리고 혈압 상승이나 높은 혈청내 콜레스테롤 농도와 같은 전신적 효과에도 영향을 미친다. 국소적으로 흡연은 순환 세포와 산소의 감소를 동반하는 치은 혈류 감소의 원인이 되어 숙주의 재생과 방어 체계의 약화를 가져오게 된다^{18,19)}. 전신적으로 흡연은 항체 생산을 감소시키고 말초 혈액 중성구 기능 특히, 화학주성과 대식 세포활동을 방해하여 면역과 염증 반응에 영향을 줄 수 있다²⁰⁾. 따라서 흡연은 직접적으로 숙

주의 방어기능을 약화시킬 수 있다.

한편, 치은 섬유아세포는 세포외 기질 성분을 만들어 내며, 이들 성분 중 교원질은 치은 구성 단백질의 60%를 차지하고 있는 중요한 구조 단백질이다. 교원질 생성뿐만 아니라 섬유아세포는 또한 교원질 분해와 I형 교원질을 끊어주는 교원질 분해효소(matrix metalloproteinase-1; MMP-1) 분비에 관여한다²¹⁾. 이외 다른 중요한 간질 분자로 fibronectin이 있으며, 이는 섬유아세포들과 세포간질에서 식세포같은 다른 종의 세포 부착을 증대하는 부착 분자이고 세포이주와 상처 치유에 중요하다. 이와 같이 치은 섬유아세포는 상처 치유와 같은 치주 결합 조직의 유지에 중요한 기능을 수행하고 있다.

담배에는 니코틴을 포함하여 다양한 nitrosamine, 미량원소 및 규명되지 않은 많은 물질들을 함유하고 있는 복합 혼합물이다. 이들 물질에 대한 세포적 반응은 담배의 특정 성분과 그 성분의 양 및 세포 유형과 관련되어 있고 또, 그들에 따라 폭 넓은 다양성을 보인다. Fang 등²²⁾의 최근 보고에 의하면, 니코틴이 쥐의 골모유사세포의 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase) 활성을 자극하고 세포의 성장을 억제한다고 한다. 이런 바람직하지 않은 효과의 대부분은 흡연 담배 미립자상의 주요 성분이며 가장 세포독성적이고 혈관 활성 성분인 니코틴의 영향이라고

여겨져 왔다^{23,24}). 실험실적으로 니코틴이 치주병에 이환된 치아의 치근면에서 발견할 수 있다고 하였으며²⁵), 세포배양 기술을 사용한 연구에서는 니코틴이 치은섬유아세포 내에 저장될 수 있고 형태를 바꿀 수 있다고 하였다²⁶). Tipton과 Dabbous는 담배 흡연자들에게서 나타나는 니코틴 농도가 인간 치은 섬유아세포의 성장을 방해한다고 하였으며²⁷), 실험실적으로 니코틴에 노출된 치은 섬유아세포들은 치근표면 부착 및 세포간질 합성 능력이 손상됨을 보였다²⁸). 그러므로 니코틴과 같은 담배 성분들은 치주염 발현에 기여할 수 있으며, 다양한 숙주의 방어체계에 직접적인 영향을 끼칠 수 있다. 니코틴은 사람 정상 치은섬유아세포에서 교원질분해효소의 활성을 증가시켜 교원질의 분해를 촉진시키고, 세포증식을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 이는 니코틴이 사람 정상 치은섬유아세포의 세포주기 진행을 억제한다는 간접적인 증거라 하겠다.

세포의 성장은 세포주기에 따라 이루어지며 세포주기의 진행은 외부적 또는 내부적 신호 전달을 이어받아 순차적으로 진행된다. 이들 진행에 있어 주기조절 단백질(cell cycle regulatory proteins)의 관여로 세포의 주기 진행이 촉진되거나 억제된다. 한편, 담배의 주요 독성 성분인 니코틴이 세포주기의 진행을 억제하는지 그리고 세포주기의 진행을 억제한다면 그 기전은 무엇인지에 대하여 아직 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구는 사람의 정상 치은섬유아세포를 대상으로 하여 다양한 농도의 니코틴에 대한 섬유아세포의 증식, 생존율, 활성도를 알아보고, 세포주기 분석을 시행하여 니코틴이 사람의 정상 치은 섬유아세포의 세포주기 진행을 조절하는지를 관찰하고, 나아가 니코틴의 세포주기 조절기전을 연구하기 위하여 세포주기 조절 단백질의 발현 양상을 알아보고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 치은섬유아세포 배양

치은섬유아세포는 원광대학교 치과병원 치주과에

내원한 건전한 치은을 가진 환자의 치은 생검을 통하여 얻었다. 생검 조직을 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Co., USA)이 담겨있는 15 ml tube에 담아 혈액이나 이물질을 제거하기 위하여 3회 세척한 후, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 1% 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Amphotericin B 25 µg/ml, Gibco Co., USA)가 첨가된 DMEM이 들어 있는 100 mm 조직배양접시에 옮겨 No. 15 blade를 사용하여 1 mm²로 세절하고, 60 mm 배양접시에 5~6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 배양기에 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양한 후, 각 배양접시 당 10% 우태아혈청과 1% 항생제가 포함된 DMEM 3 ml을 첨가하였다. 단일세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단층 밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, 0.25% trypsin/EDTA (1 ×, Gibco Co., USA)를 이용하여 세포배양 접시에 부착된 세포를 분리시킨 후 100 mm 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2~3일 간격으로 교환하였고, 계대배양은 1:3~4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 5~6회 계대배양된 치은섬유아세포를 사용하였으며, 니코틴은 다른 화합물에 의한 영향을 배제하기 위하여 순도 98% 이상의 순수한 니코틴 용액(Sigma, USA)을 가지고 1 mg/ml의 저장액(stock solution)을 준비했다.

2. 세포증식 및 생존율의 측정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내어, 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에 1 × 10⁵ 개의 세포 수가 되도록 분주하였다. 24 시간 후 배양액을 제거하고 실험군에는 0.1, 1, 10, 100 및 1000 µg/ml 씩 5가지 농도로 니코틴을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 각각 2일, 4일 동안 배양한 후 trypan-blue로 염색하고, 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포 수 및 비생활 세포 수를 계수하여 세포 증식을 및 생

존율(cell viability)을 계산하였다.

$$CV(\%) = \frac{Cv}{Cv+Cn} \times 100$$

(CV; cell viability, Cv; viable cell count, Cn; non-viable cell count)

3. MTT 분석

5. 6회 계대 배양된 치은 섬유아세포를 0.25% trypsin/EDTA로 떼어낸 후, 혈구계수기로 세포 수를 세어 24-well plate의 각 well당 1×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO₂, 100% 습도의 37°C 배양기에 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 배지를 교환하였고, 0.1, 1, 10, 100 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 씩 5가지 농도로 니코틴을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 각각 2일, 4일 동안 배양한 후, 생리 식염수에 용해한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma, USA] 용액 300 μl 씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 μl 의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA 분석기(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포 활성도를 대조군에 대한 백분율로 산출하였으며, 각각의 실험은 4회 반복 시행하였다.

4. 세포주기 분석

니코틴을 첨가한 배양액에서 배양된 세포와 대조군의 세포를 trypsin 처리하여 혈구계수기로 세포수를 측정한 다음 3×10^5 개의 세포를 인산완충용액(phosphate buffered saline, Gibco Co., USA)으로 세척하고 70% 에탄올로 고정시킨 후, RNase A (0.1 mg/ml)를 처리하여 RNA를 제거하였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 propidium iodide 용액으로 30분간 염색한 후, 유식세

포분석기(Becton, Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 488 nm에서 propidium iodide-DNA 복합체가 발색하는 형광을 측정하였다.

5. Western blot 분석

니코틴을 첨가한 배양액에서 배양된 세포를 인산완충용액으로 2회 세척한 후, lysis buffer로 세포 단백질을 추출하고, BCA 용액(Bicinchoninic acid sol., Sigma, USA)에 Copper (II) sulfate (Sigma, USA)를 50 : 1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 실험군 별로 추출된 단백질 50 μg 씩을 사용하여 15% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동을 시행한 후 PVDF (Immobilon™-P transfer membrane, Milipore Co., Bedford, MA, USA)에 옮겼다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 membrane blocking 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리한 후, 다음과 같은 1차 항체들(Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하여 90분 동안 반응시켰다; 1) 토끼로부터 추출한 CDK 4에 대한 항체, 2) 쥐로부터 추출한 cyclin D1에 대한 항체, 3) 토끼로부터 추출한 p16에 대한 항체, 4) 쥐로부터 추출한 RB에 대한 항체. 1차 항체로 반응시킨 후 blocking buffer로 2회 세척해 내고, 2차 항체로 염기성 인산분해 효소가 결합된 anti-mouse와 anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온에서 60분 동안 반응시켰고, 인산완충용액(1× PBS)으로 세척하였다. ECL 용액(Amersham, UK) A, B를 1:1로 혼합하여 반응시키고, Hyperfilm-MP (Amersham, UK)에 노출시켰다. 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 1× Ponceau S 용액(Sigma, USA)에 염색한 후 발현 정도를 서로 비교하였다.

6. 통계분석

측정한 세포 수, 생존율 및 백분율로 환산된 MTT 분석의 결과는 SPSS WIN Version 8.0 프로그램을 사용하여 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적

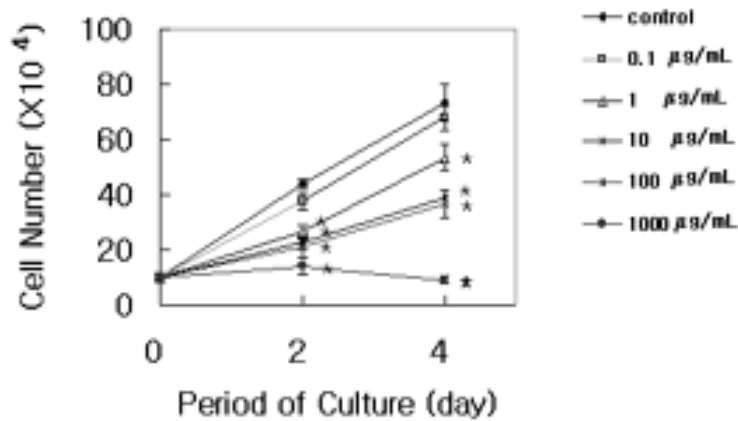


Figure 1. Proliferation of human gingival fibroblasts exposed to nicotine. 1×10^5 cells were incubated at 37°C in DMEM-1% antibiotics with or without nicotine ($0.1 \mu\text{g/ml}$ to $1000 \mu\text{g/ml}$) for 2 days or 4 days. The cells were harvested after each incubation and aliquots were counted in hemocytometer. The mean values and standard deviations of triplicate measurements in representative experiments are indicated. *: Statistically significant difference compared to control group, $P < 0.01$.

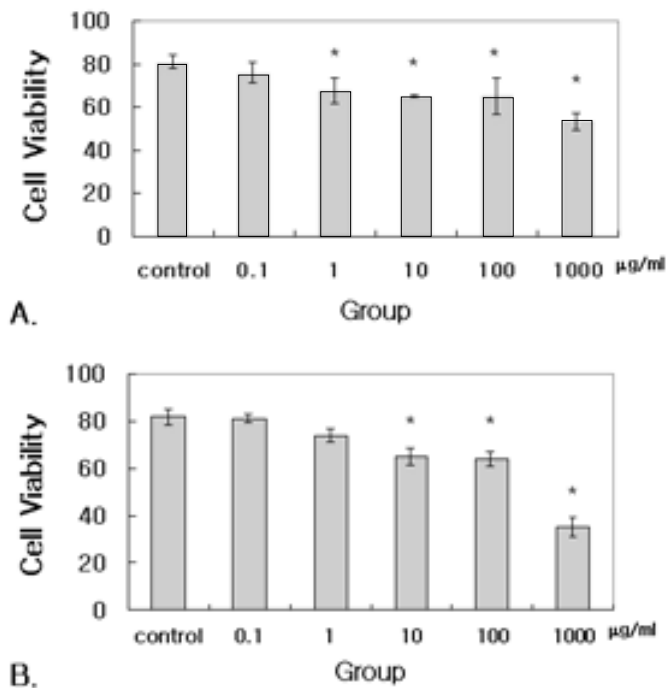


Figure 2. Viability of human gingival fibroblasts exposed to nicotine. 1×10^5 cells were incubated at 37°C in DMEM-1% antibiotics with or without nicotine ($0.1 \mu\text{g/ml}$ to $1000 \mu\text{g/ml}$) for 2 days (A) or 4 days (B). The cells were harvested after each incubation and aliquots were counted in hemocytometer. The mean values and standard deviations of triplicate measurements in representative experiments are indicated and expressed as percent of total cell count. *: Statically significant difference compared to control group, $P < 0.01$.

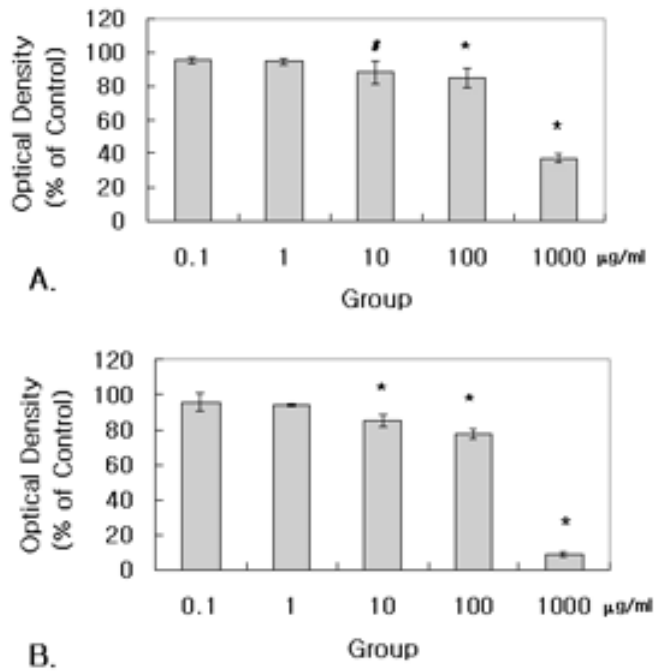


Figure 3. Activity of human gingival fibroblasts exposed to nicotine, 1×10^4 cells were incubated at 37°C in DMEM-1% antibiotics with or without nicotine ($0.1 \mu\text{g/ml}$ to $1000 \mu\text{g/ml}$) for 2 days or 4 days. MTT assay was performed after 2-day (A) and 4-day (B) incubation (Mean \pm S.E.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. *, Statically significant difference compared to control group, $P < 0.01$., #; Statically significant difference compared to control group, $P < 0.05$.

유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 처리하였다($P < 0.01$, $P < 0.05$).

III. 연구결과

1. 세포증식을 및 세포활성도

니코틴이 치은 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 배양중인 치은 섬유아세포에 0.1 , 1 , 10 , 100 및 $1000 \mu\text{g/ml}$ 씩 5가지 농도로 니코틴을 첨가하고 대조군에 증류수를 넣은 후 2일, 4일째 세포수를 측정된 결과 모든 실험군에서 농도가 증가할수록 생활 세포수의 증가량이 감소하였다. 2일 및 4일째 1 , 10 , 100 및 $1000 \mu\text{g/ml}$ 농도군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였으며 특히, 4일군의 $1000 \mu\text{g/ml}$ 농도군의 경우 다른 모든 군에 비하여

유의한 감소를 보였다($P < 0.01$)(Fig. 1). 즉, 2일 군 4일 군 모두에서 세포수가 대조군에 비하여 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에 대해서는 유의한 차가 없었으나 $1 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도부터는 세포수가 유의하게 감소하였다.

각 농도의 니코틴에 대한 치은섬유아세포의 생존율을 알아보고자 2일 및 4일째 생활세포수와 비생활 세포수를 세어 각 군에 대한 세포 생존율을 구했다. 2일군에서 1 , 10 , 100 및 $1000 \mu\text{g/ml}$ 농도군의 세포 생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고, 4일군에는 10 , 100 및 $1000 \mu\text{g/ml}$ 농도군의 세포 생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. 특히 $1000 \mu\text{g/ml}$ 농도군의 경우는 2일 및 4일 모두에서 다른 모든 군에 비하여 유의한 감소를 보였다($P < 0.01$)(Fig. 2). 2일군에서는 $1 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서부터, 4일군에서는 $10 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서부터 세포의 생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

니코틴이 치은 섬유아세포의 세포활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양중인 섬유아세포에 0.1, 1, 10, 100 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 니코틴을 첨가하고, 2일 및 4일간 배양한 후 MTT 분석으로 세포활성을 측정된 결과 2일군에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서, 4일군에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 활성도의 유의한 감소가 관찰되었다($P < 0.01$). 2일군 및 4일군 모두 10, 100 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포활성이 유의한 감소를 보였고, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 경우 다른 모든 군에 비하여 유의한 세포활성의 감소를 보였다 ($P < 0.05$)(Fig.3).

2. 세포주기 분석

니코틴이 치은 섬유아세포의 세포주기 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포의 기능 변화에 영향을 미칠 수 있는 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 니코틴이 함유된 배양액에 치은 섬유아세포를 48 시간 배양하여 세포주기를 분석한 결과 대조군과 비교하여 니코틴을 처리한 세포군에서 S 주기가 17.80%에서 14.27%로 감소하였으며, G1 주기는 46.41%에서 53.46%로 증가하였고, G2/M 주기는 10.03%에서 10.33%로 증가하였다(Fig. 4).

3. cyclin D1 및 CDK 4의 발현

Cyclin D는 CDK 4 또는 CDK 6와 결합하여, 세포

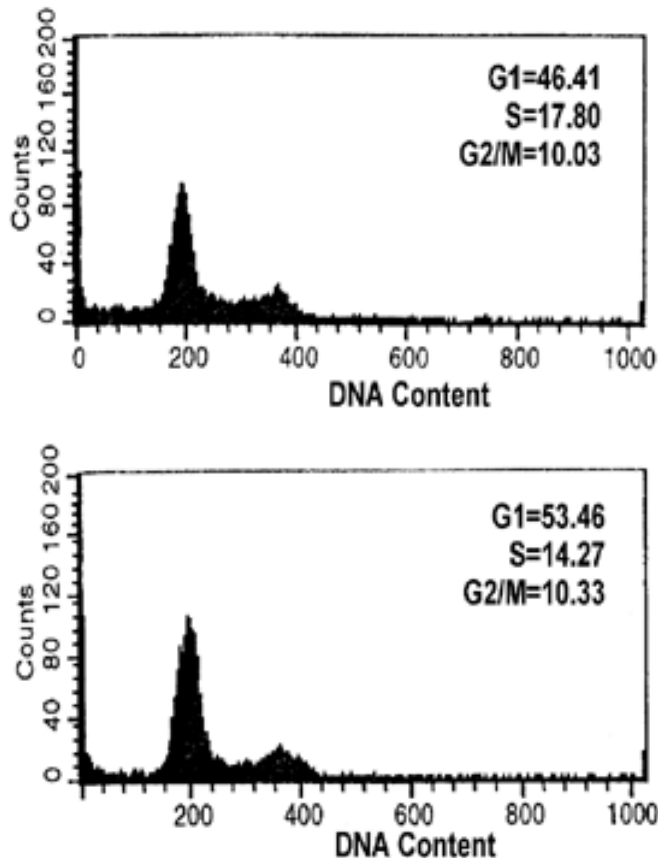


Figure 4. The effects of nicotine on the cell cycle distribution of human gingival fibroblasts. The distribution of the untreated control cell population was showed in A and the cells treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ nicotine for 48 h was showed in B.

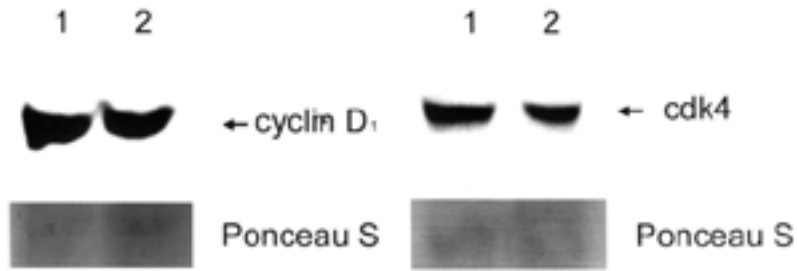


Figure 5. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin D1 and CDK 4 in cultured human gingival fibroblasts (HGFs) supplemented with 100 $\mu\text{g/ml}$ nicotine for 2 days. Cell extracts equivalent to 50 μg of total cellular protein of HGFs were electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin D1 and CDK 4 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane (1 : control, 2 : experimental).

주기 G1기의 중반기에 관여하므로 니코틴을 투여한 치은섬유아세포에서 이들 단백질의 발현을 알아보고자 Western blot 분석을 시행하였다. 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 니코틴을 투여하고 2일간 배양한 결과, 이들 단백질은 모두 대조군에 비하여 발현 양상이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

4. p16 및 pRB의 발현

세포주기 진행에 있어 p16과 pRB는 진행을 억제하는 단백질로서 니코틴의 투여가 이들 단백질 발현

에 미치는 영향을 관찰하고자 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 니코틴을 2일간 투여한 후, Western blot 분석을 시행한 결과 p16 및 pRB의 발현은 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6).

IV. 총괄 및 고찰

흡연가스는 수많은 구성 성분으로 이루어지는데, 이 중 입자상으로는 tar, nicotine, phenol, cresol, benzopyrene, B-naphthylamine, indole 등이 있고, 기체상으로는 carbon monoxide, hydrocyanic acid,

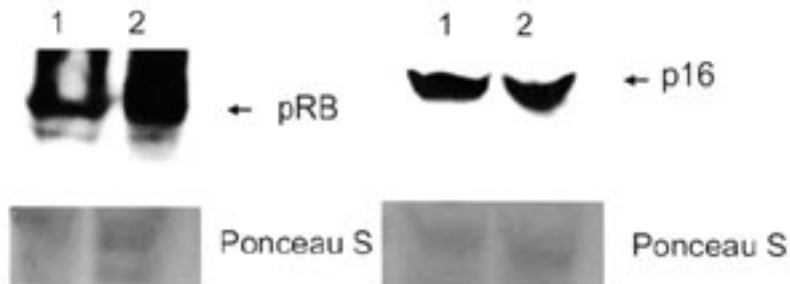


Figure 6. Western blot analysis for intracellular levels of pRB and p16 in cultured human gingival fibroblasts (HGFs) supplemented with 100 $\mu\text{g/ml}$ nicotine for 2 days. Cell extracts equivalent to 50 μg of total cellular protein of HGFs were electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of pRB and p16 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane (1 : control, 2 : experimental).

acetaldehyde, acrolein, amonia, nitrosamine 등이 그 구성성분으로 알려져 있다. 그 중 중요한 성분으로는 nicotine, carbone monoxide 등을 들 수 있는데, 특히 니코틴은 담배의 가장 특징적인 성분으로 신경 절 자극 및 억제 작용을 하는 고도의 독성 알칼로이드이다. 이런 작용은 catecholamine에 의해 매개되어 심혈관계반응을 일으킨다. 니코틴은 피부와 구강 점막의 상피벽을 쉽게 통과하여 면역학적 방어기전을 억제하고, 실험실 상에서 섬유아세포의 기능을 변형시키는 것으로 보아 치주질환의 병인에 있어 담배가 큰 기여를 하는 것은 명확하며, 뿐만 아니라 담배 성분들은 섬유아세포를 포함한 정상 창상치유 반응에 악영향을 미친다. 치은 섬유아세포는 창상 치유 반응과 정상 대사과정에 관여하는 치주 결합조직의 주요 성분이다.

니코틴은 폐에서 흡수된 후 혈액 내 반감기가 30분 정도로 빠르게 대사되어 혈중에서 제거되는 반면, 니코틴의 첫 번째 주 대사산물인 cotinine은 혈액 내 반감기가 30시간 이상으로 더 긴 생물학적 반감기를 가지고 있고 체액 내에 더 높은 농도로 존재하는 더욱 이상적인 생화학적 지표로 생각할 수 있다²⁹⁾. 그러나 본 연구에서는 구강 내 치은 섬유아세포를 대상으로 흡연에 의한 직접적인 효과를 알아보기로 니코틴을 이용하였으며, 추후 니코틴의 주 대사산물인 cotinine을 대상으로 한 세포주기 연구도 흥미로울 것으로 사료된다.

실험실 상에서 세포를 대상으로 한 연구에서 니코틴의 농도는 연구자들마다 다양한 폭으로 시행되었다. 이는 실제 흡연을 할 경우 담배의 종류, 하루 흡연 개비 수, 마지막으로 흡연한 후의 경과 시간이 각기 다르므로 흡연 당시의 구강 내 니코틴 농도를 재현하기에는 어려움이 있을 것이다. 실험실 상에서 섬유아세포의 기능에 어떤 영향을 끼칠 정도의 니코틴 농도(0.001~0.075%; 0.06~5 mM)는 대부분 혈장에서 측정되는 니코틴 농도(15 ng/ml~1.8 µg/ml; 0.1-10.8 µM)보다 높았다. 또, 타액에서 측정되는 니코틴의 농도는 96 ng/ml ~ 1.6 mg/ml로서 혈장에서 측정되는 농도보다 높게 나타났다²⁷⁾. 흡연하는 동안 구강내에서 니코틴 농도가 혈장과 타액에서 기록된

것보다 더 높게 나타난다고 보고되어³⁰⁾ 본 연구에서는 농도의 폭을 타액에서 측정되는 니코틴 농도를 포함시켜 0.1 µg/ml (0.00001% ; 0.6 µM)에서 1000 µg/ml (0.1%; 6 mM)까지 열 배 단위 농도로 나누어 5가지 농도를 이용하였다.

여러 문헌 보고에 의하면, DNA 합성과 세포 분열에 대한 니코틴의 영향에 대해 서로 상반된 연구결과들을 발표하였는데, 이는 연구 대상 세포의 종류에 따라 서로 다르게 나타났다. 예를 들어 HeLa 세포와 인간의 폐 섬유아세포³¹⁾ 또는 인간의 태아 섬유아세포³²⁾에 대해서는 니코틴이 별 다른 영향을 끼치지 않았지만, 쥐의 뇌세포³³⁾와 인간의 leukemia 세포³⁴⁾에 대해서는 감소된 DNA 합성을 보였다. 치은 섬유아세포 경우 Tipton과 Dabbous²⁷⁾는 0.001-0.075% (0.06-5 mM)의 니코틴이 세포의 증식을 억제하였고 보고한 반면, Peacock 등³⁵⁾은 가벼운 흡연자 농도 즉, 0.025 µM의 니코틴을 사람의 치은 섬유아세포에 48시간 노출시켰을 경우 세포의 수가 유의하게 증가하였다고 하였으며, 이 보다 높은 0.2 µM에서는 일시적으로 대사작용을 손상시키는 것으로 나타났지만 세포는 회복되었고 결국에는 분열이 증가하였다고 하였다. 본 연구에서는 48시간, 72시간 노출시켜 대조군과 비교시 세포수 증가 폭이 0.1 µg/ml (0.6 µM)의 농도에 대해서는 유의한 차 없이 직선적인 증가 경향을 보였으나 1 µg/ml (6 µM) 이상의 농도부터는 증가 폭의 유의한 감소를 나타냈고, 1000 µg/ml (6 mM)농도의 경우 4일째 그 수가 급격히 떨어져 초기 세포수 보다도 작게 나타났다. Tipton과 Dabbous가 이용한 농도는 본 연구의 10 µg/ml (0.06 mM) 이상의 농도로서 본 연구 결과와 동일한 결과이다. 한편 Peacock 등의 연구는 본 연구의 농도 범위보다 낮은 범위이며, 본 연구에서도 0.1 µg/ml (0.6 µM) 농도까지는 직선적인 성장곡선을 보이는 Peacock의 결과와 유사한 결과를 보였다.

세포 생존율의 경우 2일군에서는 1 µg/ml 이상의 농도에서부터, 4일군에서는 10 µg/ml 이상의 농도에서부터 세포의 생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. 즉 시간이 경과할수록 치은 섬유아세포가 높은 농도(1 µg/ml)의 니코틴에 대해 적응력을 가

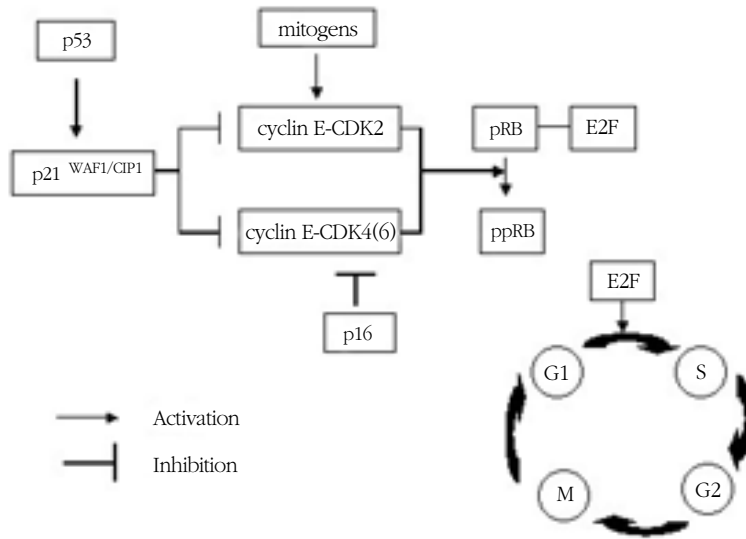


Figure 7. Regulatory proteins of cell cycle

진다는 것을 알 수 있었다. 그러나 아주 높은 농도 (1000 $\mu\text{g/ml}$)에 대해서는 생존율이 시간이 경과할수록 떨어진다는 것을 알 수 있었다. 세포 활성도의 경우, 니코틴은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 치은섬유아세포의 활성에 유의한 영향을 미치지 않았으나 10 $\mu\text{g/ml}$ (0.06 mM)이상의 농도에 대해서는 세포활성의 유의한 감소효과를 가지는 것을 알 수 있었다. 이러한 감소효과는 니코틴에 의한 섬유아세포의 세포주기 분포의 변화에 의한 것으로 생각해 볼 수 있다. 그러나 이러한 연구 결과들을 해석하는데 있어 몇 가지를 고려해야 할 것이다. 첫째로 사람의 치은 섬유아세포를 여러 환자들로부터 생검을 통하여 얻었으므로 개개 동종 섬유아세포들 간의 상호작용을 고려해야 할 것이고, 실험실과 생체 내에서 세포 행동양식의 가능한 차이를 고려해야 할 것이다. 또, 생검으로부터 얻은 치은섬유아세포의 노화 정도를 고려해야 하는데, Checchi 등³⁶⁾은 젊은 나이 그룹의 치은섬유아세포가 늙은 나이 그룹의 치은섬유아세포보다 니코틴에 대해 더 민감하다고 하였으며, 비흡연자의 치은섬유아세포가 흡연자의 섬유아세포에 비하여 더 민감하다고 하였다. 즉, 사람의 치은섬유아세포는 시간이 지날수록 독성 물질에 대해 저항성을 가지며 나이가 들수록 니코틴에 대한 저항성을 획득하는 것

으로 생각할 수 있다. 본 연구에서도 세포 생존율의 경우 2일군에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서부터, 4일군에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서부터 세포의 생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

세포주기는 G1, S, G2 및 M 기로 이루어져 있다. G1기는 첫번째 휴지기로 세포가 분열된 직후 다음의 성장과정을 시작하기 이전에 필요한 세포내 인자를 준비하는 기간이며, S기에서는 핵에 있는 유전정보를 가진 DNA의 복제가 이루어지는 시기로서 한 염색체에서 동일한 두 염색체로 되는 시기이다. 이후 세포는 G2기로 넘어가는데 필요로 하는 세포질의 인자들이 생산되면서 한 세포가 두 세포로 분열되는데 필요한 인자들이 모두 만들어지는 시기이다. M기에서는 세포질의 분열이 일어나며 세포벽이 생기면서 한 세포가 두 세포로 실제로 나뉘어지는 시기이다. 본 연구 결과에 의하면 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 니코틴을 처리한 세포군에서 S 주기가 17.80%에서 14.27%로 감소하였으며, G1 주기는 46.41%에서 53.46%로 증가하였고, G2/M주기는 10.03%에서 10.33%로 증가하였다. 이것은 첫 번째 휴지기가 증가하고 두 세포로 분열하기 위한 DNA의 합성이 감소했다는 것으로서 니코틴 투여가 치은 섬유아세포의 세포주기 진행을 억제시킨다는 것을 뜻하며, 이는 감소된 세포

증식을 결과와도 일치한다.

세포주기 진행에 있어, G1 기에서 S 기로의 이행과 관련된 조절자들로는 cyclin-CDK 복합체가 있는데, 이들이 복합체를 이루어 활성화되면, pRB 단백질을 인산화시킨다. pRB 단백질은 초기 G1기에서 전사인자인 E2F와 결합하고 있다가 cyclin-CDK에 의하여 인산화되면, E2F를 유리시킨다. 유리된 E2F는 S기에서 DNA 복제에 필요한 여러 유전자들을 합성하면서 세포주기를 진행시킨다(Fig. 7). 세포증식 촉진인자인 유사분열촉진인자(mitogen)들의 최종 표적 중의 하나가 cyclin D이며, cyclin E도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 유사분열촉진인자들에 의하여 cyclin D의 발현이 촉진되어 일정량에 이르게 되면 cyclin D는 CDK 4 혹은 CDK 6와 결합하고 CDK 4 활성화 전이효소가 CDK의 threonine을 인산화시켜 CDK가 활성을 띄게 되면, CDK는 pRB를 인산화시켜 불활성화시킨다³⁸⁾. 세포의 주기를 정확히 조절하기 위하여 세포는 cyclin이나 CDK같은 positive regulator 이외에도 p53, p16 및 p21 등의 CDK inhibitor (CKI)들을 가지고 있으며, 이들 CKI의 작용은 적절한 세포주기 조절에 negative regulator로서 필수적인 인자들이다³⁹⁾.

본 연구에서 세포주기 조절 단백질의 발현 양상을 알아보고자 시행한 western blot 분석 결과, 주기진행을 촉진시키는 능력이 있는 cyclin D와 CDK 4의 발현이 감소하였으며, 반대로 주기진행을 억제하는 작용을 가진 pRB와 p16의 발현은 증가하는 경향을 나타냈다. 이러한 세포주기 조절단백 발현 양상의 변화는 니코틴 단독의 효과인지 아니면 니코틴에 의한 이차적인 결과인지는 명확치 않다. 섬유아세포는 IL-1 β prostaglandin E₂ (PGE₂)를 포함한 다양한 cytokine을 생산할 수 있는데, Payne 등⁴⁰⁾은 썩은 담배 1% 용액이 말초 혈액 단핵구들로 하여금 PGE₂의 생산을 증가시킨다고 보고하였으며, Ko 등⁴¹⁾은 PGE₂가 사람 치은섬유아세포의 DNA 합성을 억제할 수 있다고 하였다. 이러한 여러 결과들을 고려해 보면 니코틴과 PGE₂가 섬유아세포에 대해 유사한 영향을 끼칠 수 있음을 알 수 있다. 즉, 니코틴이 섬유아세포로 하여금 IL-1 β PGE₂를 생산케하여 이러한 분

자들이 이차적으로 섬유아세포의 DNA 복제를 억제할 수 있어 세포주기 진행을 늦출 수 있을 것이다.

세포주기에 작용하는 많은 세포주기 조절단백질이 발견되고 있으나, 그 역할이 규명된 것은 많지 않다. 그러나, cyclin E와 CDK 2의 결합, cyclin D와 CDK 4, CDK 6의 결합을 통하여 pRB와 E2F간의 결합을 유리시켜 G1주기가 S주기로 이행되도록 한다⁴²⁾. Cyclin D, CDK 4와 CDK 6 등의 세포주기 조절단백질은 Cyclin E, CDK 2와 유사하게 pRB의 인산화를 증가시키지만, 니코틴은 Cyclin D와 CDK 4의 발현을 감소시키는 기전을 통하여 세포주기진행을 억제시키는 것으로 사료된다.

p53과 retinoblastoma (RB)는 종양억제자(tumor suppressors)들이다. 이들의 가장 기본적인 기능은 세포주기 진행을 차단하는 하는 것이다. p53은 p21을 활성화시키는 세포주기조절 단백질이며, p21은 cyclin E와 CDK 2, cyclin D와 CDK 4 또는 CDK 6 복합체의 활성을 억제한다. 즉 p53의 증가는 세포가 G1기에서 S기로 전이되는 것을 억제하여 세포주기진행을 억제하는 결과를 초래할 것이다(Fig. 7). RB는 전사인자들 중 하나인 E2F라고 알려진 전사인자의 활성을 억제한다. 저인산화 상태인 pRB는 이들 전사인자를 차단하며, CDK에 의하여 과인산화된 ppRB는 세포가 S 주기로 들어가도록 한다(Fig. 7). p16은 cyclin D와 CDK 4 복합체의 활성도를 억제하는데 그 기전은 cyclin D가 CDK 4에 결합하는 장소에 경쟁적으로 작용함으로써 이루어지는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 따라서 p16의 발현증가는 cyclin D와 CDK 4 복합체의 활성으로 억제하고 결과적으로 세포주기의 진행을 억제한다. 본 연구에서 니코틴은 pRB 및 p16의 발현을 증가시켰으며 이는 주기 진행의 억제로 나타날 것이다. 이러한 실험결과는 니코틴이 치은섬유아세포의 세포주기 진행을 억제시키며, 그 기전은 cyclin D와 CDK 4의 발현억제, p16 과 pRB의 발현 증가를 유발함으로써 이루어지는 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 담배의 주요 독성 성분인 니코틴을 실험

실 상에서 사람의 치은섬유아세포에 0.1, 1, 10, 100 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 씩 5가지의 농도로 첨가하고 대조군에 증류수를 넣은 후 2일, 4일 째 세포의 증식율, 생존율, 활성도를 알아보고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 48 시간 처리한 후 세포주기 분석을 시행하고, 세포주기 조절단백질의 발현을 관찰하여 니코틴이 세포주기 조절기전에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 증식율의 경우 2일군, 4일군 모두 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도부터는 증가량이 대조군에 비하여 작았고, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 경우 4일째 그 수가 급격히 떨어져 초기 세포수 보다도 작게 나타났다($P<0.01$).
2. 세포 생존율의 경우 2일군에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서부터, 4일군에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서부터 대조군에 비하여 감소하였다 ($P<0.01$).
3. 세포 활성도의 경우 2일군에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서, 4일 군에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에 대하여 세포활성의 감소가 관찰되었다 ($P<0.01$).
4. 치은섬유아세포를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 니코틴 농도에 2일간 배양하여 세포주기를 분석한 결과 대조군에 비하여 S 주기가 17.80%에서 14.27%로 감소되고, G1 주기는 46.41%에서 53.46%로 증가되며, G2/M주기는 10.03%에서 10.33%로 증가하는 경향을 보였다.
5. 치은섬유아세포에 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 니코틴 농도에 2일간 배양하여 세포주기 조절 단백질 발현을 분석한 결과 cyclin D₁ 및 CDK 4 의 발현은 대조군에 비하여 감소하였고, p16 및 pRB의 발현은 증가하였다.

이러한 실험결과는 니코틴이 치은섬유아세포의 증식 및 세포주기 진행을 억제하며, 그 기전은 cyclin D와 CDK4의 발현감소, p16 과 pRB의 발현 증가를 유발함으로써 이루어지는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Ismail AI, Morrison EC, Burt BA, Caffesse RG, Kavanagh MT. Natural history of periodontal disease in adults: findings from the Tecumseh Periodontal Disease Study, 1959-87. *J Dent Res* 1990;69(2):430-5.
2. Bergstrom J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989;17(5):245-7.
3. Haber J, Kent RL. Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol* 1992;63(2):100-6.
4. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65(3):260-7.
5. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol* 1983;54(8): 481-7.
6. Bergstrom J, Eliasson S, Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol* 1991;62(4):242-6.
7. Preber H, Bergstrom J. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Clin Periodontol* 1990;17(5):324-8.
8. Newman MG, Kornman KS, Holtzman S. Association of clinical risk factors with treatment outcomes. *J Periodontol* 1994;65(5 Suppl):489-97.
9. Ah MK, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1994;21(2):91-7.
10. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking and bone loss among postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1991;6(4):331-8.

11. Tomar SL, Swango PA, Kleinman DV, Burt BA. Loss of periodontal attachment in HIV-seropositive military personnel. *J Periodontol* 1995;66(6):421-8.
12. Schenkein HA, Gunsolley JC, Koertge TE, Schenkein JG, Tew JG. Smoking and its effects on early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc* 1995;126(8):1107-13.
13. Lakier JB. Smoking and cardiovascular disease. *Am J Med* 1992;93:8S-12S.
14. Karjalainen KM, Knuutila ML, von Dickhoff KJ. Association of the severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *J Periodontol* 1994;65(11):1067-72.
15. Ravald N, Birkhed D, Hamp SE. Root caries susceptibility in periodontally treated patients. Results after 12 years. *J Clin Periodontol* 1993;20(2):124-9.
16. Christen AG. The clinical effects of tobacco on oral tissue. *J Am Dent Assoc* 1970;81(6):1378-82.
17. Bastiaan RJ, Reade PC. The effects of tobacco smoking on oral and dental tissues. *Aust Dent J* 1976;21(4):308-15.
18. Bergstrom J, Preber H. The influence of cigarette smoking on the development of experimental gingivitis. *J Periodontol Res* 1986;21(6):668-76.
19. Bergstrom J, Persson L, Preber H. Influence of cigarette smoking on vascular reaction during experimental gingivitis. *Scand J Dent Res* 1988;96(1):34-9.
20. Finklea JF, Hasselblad V, Riggan WB, Nelson WC, Hammer DI, Newill VA. Cigarette smoking and hemagglutination inhibition response to influenza after natural disease and immunization. *Am Rev Respir Dis* 1971;104 (3): 368-76.
21. Dabbous MK, Hammouda O, Brinkley B. Isolation and partial characterization of bovine gingival AB collagen. *Mol Cell Biochem* 1981; 28:34(2):87-93.
22. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone* 1991;12(4): 283-6,22.
- Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med* 1986;37:21-32.
23. Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med* 1986;37:21-32.
24. Seow WK, Thong YH, Nelson RD, MacFarlane GD, Herzberg MC. Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation* 1994;18(2):119-27.
25. Cuff MJ, McQuade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol* 1989;60(10): 564-9.
26. Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991;62(2): 147-52.
27. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66(12):1056-64.
28. Raulin LA, McPherson JC 3d, 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(5):318-25.
29. Williams CL, Eng A, Botvin GJ, Hill P, Wynder EL. Validation of students' self-reported cigarette smoking status with plasma cotinine levels. *Am J Public Health* 1979;69(12):1272-4.
30. Bernzweig E, Payne JB, Reinhardt RA, Dyer JK, Patil KD. Nicotine and smokeless tobacco effects on gingival and peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Periodontol* 1998;25(3):246-52.
31. Altmann H, Weniger P, Dolejs I. Influence of nicotine on DNA metabolism. *Klin Wochenschr* 1984;62 Suppl 2:101-4.
32. Csonka E, Somogyi A, Augustin J, Haberbosch W,

- Schettler G, Jellinek H. The effect of nicotine on cultured cells of vascular origin. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985;407(4):441-7.
33. Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, Whitmore WL, Seidler FJ. Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;240(2):602-11.
34. Konno S, Chiao JW, Wu JM. Effects of nicotine on cellular proliferation, cell cycle phase distribution, and macromolecular synthesis in human promyelocytic HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett* 1986;33(1):91-7.
35. 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(7):658-65.
36. 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(10):636-42.
37. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995;15(5):2612-24.
38. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993, 7;73(3):487-97.
39. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995, 15;9(10):1149-63.
40. Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Maze CR, Dyer JK, Patil KD. Smokeless tobacco effects on monocyte secretion of PGE₂ and IL-1 beta. *J Periodontol* 1994;65(10):937-41.
41. Ko SD, Page RC, Narayanan AS. Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(8):3429-32.
42. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993, 18;73(6):1059-65. Review.
43. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 16;366(6456):704-7.

Effects of Nicotine on the Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins of Human Gingival Fibroblasts

Tak Kim¹, Jae-ho Kim¹, Sung-Hee Pi¹, Eun-Cheol Kim²,
Yong-Ouk You³, Hyung-Keun You¹, Hyung-Shik Shin¹

¹ Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

² Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Wonkwang University

³ Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University

Normal gingival fibroblasts functioning is fundamental for the maintenance of periodontal connective tissue as well as wound healing. Nicotine have been found to affect DNA synthesis and cell proliferation, which appear to depend on the type of cells. This in vitro study was done to determine the effects of nicotine, a major component of tobacco, on cell proliferation, viability, activity, cell cycle distribution, and expression of cell cycle regulatory proteins in human gingival fibroblasts. Nicotine has been tested for 2 days or 4 days in 5 different concentrations; 0.1 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$; 1000 $\mu\text{g/ml}$. To assess cell proliferation and viability, viable and non-viable cells were counted by hemocytometer; to evaluate cellular activity, MTT assay was employed; to analyze cell cycle distribution, fluorescent propidium iodide-DNA complex were measured using fluorocytometer; to determine the expression of cell cycle regulatory proteins, western blot analysis was performed. After 2 days and 4 days incubation respectively, at concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ - 1000 $\mu\text{g/ml}$, nicotine significantly inhibited proliferation comparing to non-supplemented controls. The cell viability was significantly decreased after 2 days and 4 days at concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ - 1000 $\mu\text{g/ml}$ and at 10 $\mu\text{g/ml}$ - 1000 $\mu\text{g/ml}$ respectively. After 2 days and 4 days, the cellular activity was significantly decreased at concentrations of 10 $\mu\text{g/ml}$ - 1000 $\mu\text{g/ml}$. Treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ nicotine for 48 hours caused an increase in the proportion of G1-phase cells (from 46.41% to 53.46%) and a decrease in the proportion of S-phase cells (from 17.80% to 14.27%). The levels of cyclin D1 and CDK 4 proteins in nicotine-treated fibroblasts were lower than that of controls, whereas the levels of p16 and pRB were higher than that of controls. These results suggest that the decrease of cell proliferation and lengthened Gap phases (G1) by nicotine may due to the increased expression of p16 and pRB as well as decreased expression of cyclin D1 and CDK 4 in human gingival fibroblasts.

Key Words : nicotine, human gingival fibroblast, cell cycle, cyclin D, CDK4, pRB, p16