

니코틴이 사람태아골모세포의 광물화 과정에 미치는 영향

임성우 · 한상현 · 이성진 · 유석주 · 신형식 · 유형근

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

담배는 각종 질환을 유발할 수 있으며, 인류의 건강을 위협할 수 있는 잠재적인 위험요소를 가지고 있다. 예를 들어 위장관계 질환, 심맥관계 질환, 뇌혈관계 질환 등도 흡연과 관련이 있다.¹⁾

치주 질환과 관련하여 흡연시 담배연기의 정확한 역할은 아직 확실하게 정립되지 못한 상태이며 역학적인 자료만이 흡연이 위험인자임을 암시해 주고 있다. 최근의 연구에서는 흡연과 치주조직의 파괴²⁾³⁾ 치주치료에 대한 반응⁴⁾⁵⁾ 그리고 치조골 소실⁶⁾⁷⁾ 사이에 강한 상관관계에 대하여 보고하고 있다. 그리고, 치료 후 상처 부위의 치유 과정에서, 흡연시 치주관막술 후⁸⁾, 구강외과 술식후⁹⁾, 조직 이식술후¹⁰⁾ 창상의 치유 과정이 불량하다고 보고하였다. 따라서, 흡연은 통상적인 치주치료 후 회복을 지연시키고, 비외과적, 외과적 술식후 회복에 있어서 악영향을 끼친다고 할 수 있다.

니코틴은 1-Methyl-2-(3-pyridyl)pyrrolidine와 동의어로써, C₁₀H₁₄N₂의 분자식을 갖는다. 니코틴의 성질은 끈적임이 있고 무색 또는 옅은 노란색의 기름형태로 온도가 따뜻해지면 약간의 생선 냄새가 난다.

그리고, 공기와 접촉하면 갈색으로 변하며, 니코틴과 그 염은 의약품, 살충제로 사용된다.¹¹⁾

흡연에 대한 세포학적 반응은 연구 논문들마다 상반된 연구 결과를 보이기도 하는데 이는 세포 종(species)과 골모세포 모델의 종류에 따라 다르다. 예를 들어 쥐의 뇌세포¹²⁾와 사람의 백혈병 세포¹³⁾에서는 DNA의 합성이 감소되나, HeLa cell¹³⁾, 사람 폐 섬유아세포¹³⁾, 사람 태아 섬유아세포¹³⁾는 영향을 받지 않는다고 하였다. 그리고, 치은 섬유아세포에서는 세포 증식을 억제하며¹⁴⁾, Chamson과 Frey¹⁵⁾는 피부 섬유아세포에서 교원질 합성이 증가된다고 보고하였다.

그리고, 니코틴이 치주조직중 골에 대한 반응으로 Hollinger¹⁶⁾는 동물실험에서 치유시 부정적인 영향을 끼친다고 하였고, Pinto¹⁷⁾는 토끼 실험에서 발치 후 치유가 지연되며 니코틴 투여량과도 상관관계가 있다고 한 반면, Nociti¹⁸⁾ 등은 토끼실험에서 임플란트 주위에 골밀도의 변화가 없다고 하였다.

니코틴이 골모세포에 미치는 영향에 대해서 Fang 등¹⁹⁾의 연구에서는 니코틴이 쥐의 골모유사세포(osteoblastic-like cell)의 염기성 인산분해효소 활성을 자극하며 세포의 성장을 억제한다고 하였다. 그

*이 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행된
교신 저자: 유형근, 전복 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 570-749

리고, 반대로, Ramp 등²⁰⁾은 쥐 실험에서 니코틴이 콜라겐 합성과 염기성 인산 분해 효소(ALP)의 활성을 저해하지만, 골모 유사세포에서 DNA 합성을 촉진한다고 주장하였다.

이들 효과는 담배 입자상의 주요한 성분이며 혈관 활성화와 세포 독성을 가지는 니코틴의 영향이라고 말할 수 있다.²¹⁾

따라서, 본 연구는 이상과 같이 세포에 따라 다른 결과를 보이는 니코틴이 사람의 태아골모세포의 세포 광물화 과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실시하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 골모세포 배양

저농도(100pg/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml)와 고농도(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml)의 니코틴 용액(Sigma Chemical Company, USA)을 준비 후, 태아골모세포주(hFOB1 1.19; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, NY, USA)과 0.03mg/ml의 G-418(Duchefa, Netherlands)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, MO, USA) 2ml가 담긴 6-well 배양접시에 well당 5×10^4 개의 세포를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도 조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하고, 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다.

2. 염기성 인산분해효소(Alkaline Phosphatase, ALP) 활성 측정

태아골모세포를 6-well 배양접시에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층이 형성될 때까지 34°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양

하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 Mixture로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 니코틴을 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 저농도(100pg/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml)와 고농도(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml)의 니코틴을 첨가하여 분주한 후 3일 동안 각각 배양하였다. 일정배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리후, 1,500rpm에서 6분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1ml에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2ml, 15mM의 p-nitrophenyl phosphate(pNPP; Sigma, USA) 0.1ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1ml와 멸균된 증류수 0.1ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. 배양된 세포는 96-well 배양접시에 옮기고, p-NPP의 가수분해는 410nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타내며, p-nitrophenol (p-NP; Sigma, USA)을 기준 값으로 이용하였다. 단백질농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, ALP 활성도는 nM/30min/mg of protein으로 표시하였다.

3. 칼슘축적 측정

6-Well 배양접시에 1×10^5 개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 적정농도로 23일간 배양하였다. extracellular matrix mineralization을 유도하기 위해 21째 되는 날, 4mM/L NaHPO₄를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red sulfate(AR-S, Sigma) 염색 방법을 사용하였다. 23일이 지난 후 배지를 제거하고, phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 한시간 동안 4°C에서 고정하고 ethanol를 제거한 후 40mM/L AR-S(pH 4.2)로 실온에서 10분 동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고

멸균증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 육안으로 비교 관찰하기 위하여 digital color camera (SDC-430PF, Samsung Co., Seoul, Korea)로 촬영한후, 이를 계량적으로 비교하기 위하여 10mM/L sodium phosphate(pH 7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 AR-S의 농도를 562nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S standard curve는 같은 용액을 사용하였다.

4. 통계분석

통계학적 유의성은 SPSS 10.0 Version 프로그램을 사용하여 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)를 이용하여 처리하였다($p < 0.05$).

III. 연구결과

1. 염기성 인산분해효소의 활성화도 측정

니코틴 100pg/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml을 태아골모세포에 투여하여, 국소적 인산이온 농도를 증가시키는 ALP의 합성을 측정된 결과 음성 대조군과 비교하여 양성 대조군에서는 유의하게 증가하였으나, 저농도 니코틴에서는 유의한 차이가 없었으며, 고농도 니코틴 10 μ g/ml, 100 μ g/ml에서는 ALP 활성화도가 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$)(Table 1, Figure 1).

2. 칼슘 측정

태아골모세포에 니코틴 100pg/ml, 1ng/ml, 10ng/

Table 1. ALP activity of hFOB1 exposed to nicotine (Mean \pm S.D.)

negative control	positive control	100 pg/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml
0.234 \pm 0.01	0.351 \pm 0.02*	0.236 \pm 0.02	0.238 \pm 0.01	0.240 \pm 0.01	0.237 \pm 0.03	0.202 \pm 0.01	0.155 \pm 0.01*	0.107 \pm 0.01*

* Statistically significant compared to the negative control ($p < 0.05$).

C(negative control): added distilled water

C*(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

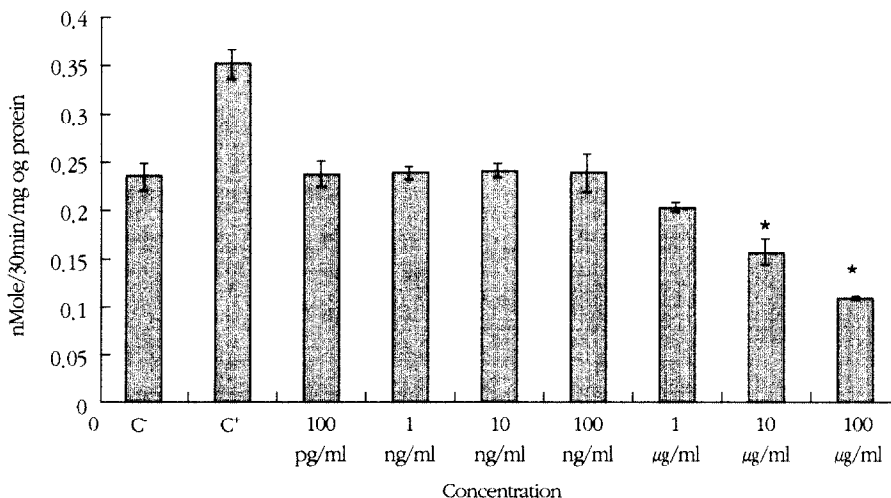


Figure 1. ALP activity of hFOB1 exposed to nicotine.

C: negative control, C*: positive control

Table 2. Calcium accumulation assay of hFOB1 exposed to nicotine. (Mean±S.D.)

negative control	positive control	100 pg/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
302.81±0.02	539.00±0.02*	294.72±0.02	318.56±0.01	307.00±0.01	266.00±0.03	191.68±0.01*	170.40±0.01*	129.00±0.01*

* Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C(negative control): added distilled water

C*(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

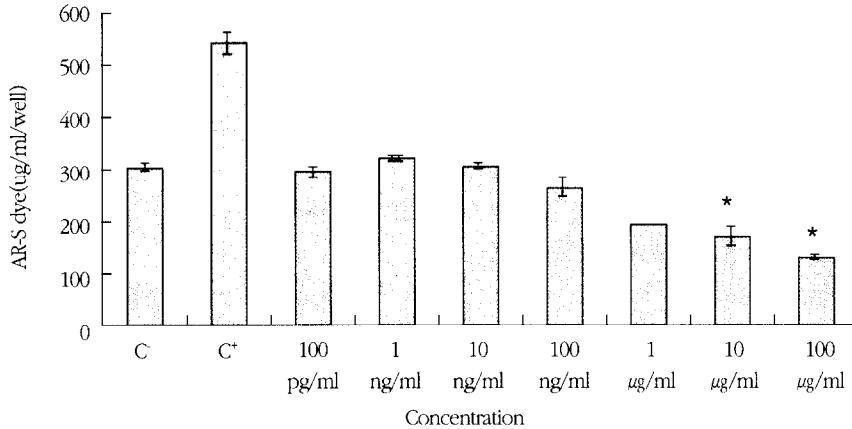


Figure 2. Calcium accumulation assay of hFOB1 exposed to nicotine.

C-negative control, C+positive control

ml, 100ng/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml 투여하고 23일 동안 배양한 후 석회화된 결절을 계량한 결과 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 유의하게 증가하였지만, 고농도 니코틴 1µg/ml, 10µg/ml, 100 µg/ml 처리군에서는 음성대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였다(p<0.05)(Table 2, Figure 2).

그리고, AR-S로 염색된 석회화 결절을 육안으로 비교하였을 때, 저농도의 니코틴에서는 음성대조군과 비슷한 수준의 결절수를 보였지만, 고농도에서는 농도가 높아질수록 결절 형성이 거의 없어지는 양상을 보였다(Figure 3).

IV. 총괄 및 고찰

담배 연기 속에는 약 4000 여종의 화학 물질이 함유되어 있으며 이러한 물질들이 폐암, 심장질환, 후

두암, 식도암, 췌장암, 신장암, 방광암등 각종 질환과 관련된다. 그리고, 동맥 경화 등을 촉진시켜 심장병을 일으키고 돌연사의 원인이 되기도 한다. 또한 흡연 중독시 주요 증상으로는 구토와 설사 등이 있다.

흡연의 위해한 영향은 약리학적으로 활성 물질인 니코틴과 가장 연관이 있다, 대부분의 니코틴은 폐포를 통해 흡수되고 일부는 피부나 구강점막을 통해서서히 흡수되며 약 30%는 자유기 (free form)로 남으며 지용성이 강하여 세포막을 쉽게 통과한다. 약리학적 작용은 아세틸콜린 작용과 같이 자율 신경절 내의 니코틴성 수용체와 결합하여 초기에 흥분 작용을 나타내며, 그 후 신경절 봉쇄 현상마저 일어난다. Adrenal glands에서 유리된 epinephrine과 동맥 혈관 벽에서 norepinephrine이 방출되는데, 이것은 심혈관 계통에 영향을 미치며 특히 말초혈관 수축은 치은 혈류 감소를 야기하여 필수 영양분 공급과 국소면역체계 효능을 감소시켜 창상의 회복을 지연시

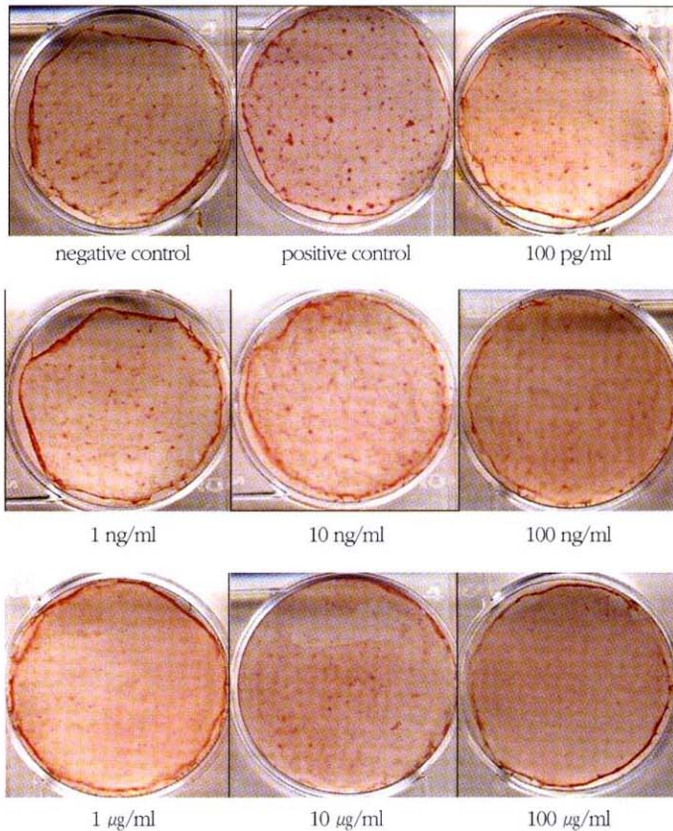


Figure 3. AR-S staining of hFOB1 exposed to nicotine at 23-days of incubation. The mineralized matrix was stained with AR-S for calcium.

킨다고 보고하고 있다. ^{22),23)}

담배의 구성 성분중 체내에 흡입된 니코틴의 70-80% 정도는 코티닌으로 전환되고, 코티닌의 10-15%가 소변으로 배출되며, 나머지는 4-oxo-4-(3-pyridyl)butanoic acid (keto acid) 형태로 전환되며, keto acid의 85%는 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid(hydroxy acid)로 전환되어 소변으로 배설된다. 코티닌으로 대사되지 않은 니코틴 중에서 4%는 flavin-containing monooxygenase(FMO)에 의해 Nicotine-1-N-oxide로 전환되어, 대부분 그대로 소변으로 배설되며 ¹⁹⁾니코틴의 80-90%는 뇨 대사물로서 배설된다. ²⁴⁾

실험실상에서 세포를 대상으로 한 연구에서 니코틴의 농도는 연구자마다 다양한 폭으로 시행되었는

데, 실제 흡연시 담배의 종류, 하루 흡연 개비수, 마지막으로 흡연한 후의 경과 시간이 각기 다르기 때문에 흡연 당시의 구내 니코틴의 농도를 재현하기는 어렵다. 또한, 흡연자의 혈중 니코틴 농도는 15ng/ml-73ng/ml이며 씹는담배로 사용하는 사람의 타액 농도는 70-1560ng/ml로 혈중 농도보다 높게 나타났다. ²⁵⁾ 흡연하는 동안 구강 내에서 니코틴 농도가 혈장과 타액에서 보다 높게 나타난다고 보고되며, 본 연구에서는 농도의 폭을 혈중과 타액에서 측정되는 니코틴 농도를 포함하여 7가지 농도를 선택하여, 저농도(100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml)와 고농도(1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml)로 분류하였다.

여러 문헌들에 의하면, 니코틴의 농도에 따라 세포에 미치는 영향에 대하여 Raulin등 ²⁶⁾의 세포내로 흡

수되는 니코틴은 억제수준의 농도가 있으며, 이 농도 이전까지의 농도에서는 세포의 분열 자극이 있다고 보고했다. 또한, 일정농도 이상의 니코틴에 노출시 세포수의 감소 현상은 세포주기의 변화로 인한 복제 능력의 이상으로 분화되는 세포의 형태가 훨씬 둥근 모습을 보이는데 이런 현상으로 세포의 부착능력 저하를 가져오거나 세포 조작동안 많은 세포손실을 가져올 수도 있다. 또한 니코틴에 노출시 세포내 내부 농도가 위해한 정도까지 증가될 때에는 세포분화의 자극원으로 작용할 수 있으나 내부 농도가 증가되어 일정농도 이상인 경우 독성에 의해 세포가 사멸될 수 있다. Peacock 등²⁷⁾은 낮은 농도의 니코틴 (0.025 μ M)에서 치은 섬유아세포는 세포증식이 현저히 증가된다고 보고하였다.

본 연구에서는 저농도의 니코틴에 노출시 골모세포의 ALP 활성도가 약간 증가하긴 하였으나, 유의성은 갖지 못하였다. 그리고, 실험군의 니코틴 농도간에도 차이를 보이지 않았다. 이는 일정농도까지는 니코틴이 자극원이나 독성 효과 없이 염기성 인산분해효소의 활성에 별다른 영향을 주지 않음을 시사한다. 그리고, 고농도에서는 ALP 활성도가 감소하였으며, 통계적 유의성을 보임으로써, 일정 농도 이상에서 골모세포에서 유해한 효과를 보임을 알 수 있었다(Table 1, Figure 1).

사람의 태아 골모세포를 실험대상으로 한 본 실험에서 다른 여러 실험들과 세포의 종류는 다르지만 고농도의 니코틴이 골모 세포에 유해한 영향을 준다는 사실을 확인하였고, 같은 농도와 같은 조건에서 골모세포와 섬유아세포를 비롯한 다른 세포들과 비교 연구가 추가로 필요하다고 사료된다.

흡연과 골 형성 또는 흡수와의 관계에 대하여 Nociti 등¹⁸⁾은 토끼에서 식립된 타이타늄 임플란트 주위에서 골 밀도가 니코틴의 영향을 받지 않는다고 보고하였고, Hollinger 등¹⁶⁾은 니코틴을 투여한 동물 실험에서 골 치유시 골모세포의 기능이 감소되며, 자가골 이식시 이식편에 부정적인 역할을 미치며, 공여부의 치유가 늦어진다고 보고하였다. 또한, Pinto 등¹⁷⁾은 토끼모델에서 발치와의 치유기간동안 치조골의 치유를 지연시키며 니코틴의 투여량과도 관계가

있다고 하였다. Riebel 등¹⁸⁾은 토끼모델에서 해면골 이식후 융합시에 니코틴이 이식재안에서 혈관 성장이 감소한다고 보고하였다. 그리고, Daftari 등²⁹⁾은 토끼실험에서 골이식후 재혈관화가 일부 지연되었고, 이식재의 괴사가 일어났다. 카페인과 니코틴의 부정적인 역할에 대하여 Leblebicioglu 등³⁰⁾은 생쥐 (mouse) 태아의 성장과 골화에서 카페인이 니코틴보다 더 큰 영향을 끼친다고 하였고, Nash 등³¹⁾은 쥐 실험에서 골격 성장이 지연되며 비정상적으로 만드는 빈도가 증가한다고 보고하였다. 반면에 다른 견해로 Nociti 등³²⁾은 수컷 Wistar 쥐에서 니코틴 자체가 치조골 소실을 일으키지는 않는다고 하였다.

본 연구를 통해 우리는 고농도의 니코틴에 노출되었을 때 골 재형성 과정중 골모세포의 광물화 과정에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났고, 이는 AR-S 염색법을 통한 칼슘축적 실험을 통해 확인할 수 있었다. 또한 실험과정 중 니코틴의 농도와 석회화 결절의 수가 어느 정도 상관 관계가 있음을 미루어 짐작할 수 있었다.

본 연구에서 측정된 염기성 인산분해효소(ALP)는 100,000에서 200,000 분자량을 갖는 세포막에 결합된 당단백의 한 종류로서 골모세포에 풍부하고 양전하를 가진 분자에 대한 친화성이 있어서 칼슘수송에 중요한 연관이 있으며 골모세포의 확인을 위한 생화학적, 조직화학적 이정표로 사용될 뿐 아니라 골모세포의 분화 및 골 형성의 척도로서 사용되고 있다.³³⁾

본 연구에서 골 광물화 과정중 칼슘축적 정도를 알아내기 위하여 AR-S 염색법을 사용하였는데, 이 염색법은 세포의 형태학적 특성 분석 즉 세포의 경계부위를 염색하여 세포의 밀도, 면적, 주변둘레, 한 변의 길이 등을 광학 현미경으로 촬영후 분석할 수 있다. 특히 AR-S 염색법은 칼슘염에 특이하게 반응하여 칼슘과 칼슘간에 reddish-orange complex를 형성하는 견본에서 적은 양의 칼슘을 알아내는데 유용하다³⁴⁾. 반면에 다른 염색법으로 von Kossa 염색법이 있지만, 이는 음이온인 phosphate와 carbonate, salts를 증명하는데 사용되어³⁵⁾³⁶⁾, 본 연구에서는 제외시켰다.

본 실험연구 결과 고농도의 니코틴에서 태아골모세포의 염기성 인산분해효소의 합성을 감소시키며,

칼슘축적 형성에 유해한 효과를 보임으로써 니코틴이 골의 형성과 재생 및 치유과정을 저해하거나 지연시킬 수 있음을 알수 있었다.

지금까지의 여러 실험을 통하여 니코틴이 골모세포에 미치는 영향에 대한 연구는 많이 진행되었으나 그 정확한 기전을 이해하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 결론

니코틴이 골모세포의 광물화 과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자, 사람태아골모세포주의 골형성시 국소적 인산이온의 농도를 증가시키는 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정하고, 골모세포 배양시 생성된 칼슘염의 양을 알아보고자 AR-S 염색법으로 석회화 결절을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 태아골모세포의 배양에서 염기성 인산분해효소의 활성도를 평가한 결과 음성 대조군에 비하여 니코틴을 투여한 실험군들중 저농도에서는 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 고농도의 10 μ g/ml, 100 μ g/ml에서는 농도가 증가할수록 유의하게 감소하였다. (p>0.05)
2. 태아골모세포에 니코틴을 투여후 칼슘축적을 측정한 결과, 음성 대조군에 비하여 니코틴을 투여한 실험군들중 고농도 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 농도가 증가하면서 유의하게 감소하였다. (p>0.05)
3. AR-S 염색법으로 붉게 염색된 칼슘축적을 관찰할 결과, 고농도의 니코틴 투여군에서 음성대조군 및 저농도의 니코틴 투여군에 비하여 뚜렷하게 감소된 수의 석회화 결절이 나타났다.

이상과 같은 소견으로 고농도의 니코틴은 골모세포의 분화를 억제하는 것으로 보이지만 더욱 다양한 종(species)과 다양한 니코틴의 농도를 적용한 실험을 통하여 골세포에 대한 nicotine의 평가가 이루어져야 한다고 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. 김재호, 신형식, 김탁 등 : 니코틴이 치은섬유아세포의 세포주기 조절 단백질 발현 에 미치는 영향. 대한치주과학회지 31(3):597-611, 2001.
2. Haber J, Kent RL. : Cigarette smoking in a periodontal practice. J Periodontol 63(2):100-6, 1992.
3. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al : Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol 65(3):260-7, 1994.
4. Preber H, Bergstrom J. : Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. J Clin Periodontol 17(5):324-8, 1990.
5. Newman MG, Kornman KS, Holtzman S. : Association of clinical risk factors with treatment outcomes. J Periodontol 65(5 Suppl):489-97, 1994.
6. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL. : Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. J Periodontol 54(8):481-7, 1983.
7. Bergstrom J, Eliasson S, Preber H. : Cigarette smoking and periodontal bone loss. J Periodontol 62(4):242-6, 1991.
8. Preber H, Bergstrom J. : Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. J Clin Periodontol 17:324-328, 1990.
9. Preber H, Bergstrom J. : Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. Scan J Dent Res 94:102-108, 1986.
10. Goldminz D, Bennet RG. : Cigarette smoking to localized osteitis. J Oral Surg 37:732-735, 1979.
11. Hayesm Jr, W.J. : Pesticides Studied in Man, pp. 86-91. Williams & Wilkins, Baltimore (1982).
12. Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, et al : 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.
13. 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*(Netherlands) 33:91-97, 1986.
 14. Tipton DA, Daddous MK. : Effects of Nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 66:1056-1063, 1995.
 15. 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.
 16. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. : Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 15:45(4)294-301, 1999.
 17. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. : Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histologic study. *Braz Dent J* 13(1): 3-9, 2002.
 18. Nociti FH, Stefani CM, Sallum EA, et al : Nicotine and bone density around titanium implants : a histometric study in rabbits. *Implant Dent* 11(2): 176-82, 2002.
 19. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, et al. : Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Clinical pharmacology of nicotine*. *Annu Rev Med* 37:21-32, 1986.
 20. Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. : Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 197(1):36-43, 1991.
 21. Benowitz NL. : Clinical pharmacology of nicotine. *Annu Rev Med* 37:21-32, 1986.
 22. Clarke NG, Shepherd BC : The effects of epinephrine and Nicotine on gingival blood flow in the rabbit. *Arch Oral Biol* 29:789-793, 1984.
 23. Mosely LH, Finseth F. : Cigarette smoking : impairment of digital blood flow and wound healing in the hand, *Hand* 9:97-100, 1977.
 24. Kyerematen GA, Mongan ML, Chattopadhyay B, et al. : Disposition of nicotine and eight metabolites in smokers and nonsmokers : identification in smokers of two metabolites that are longer lived than cotinine. *Clin. Pharmacol. Ther* 48: 641-651, 1990.
 25. Tipton DA, Dabbous MK. : Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1991; 62 (2): 147-52.
 26. Bissada NF, et al. : Neutrophil functional activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. *J Periodont Res* 17:500-502, 1982.
 27. Peacock ME, et al. : The effect of Nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblast in vitro. *J Periodontol* 64:658-665, 1993.
 28. Riebel GD, Boden SD, Whitesides TE, Hutton WC. : The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine*, Oct 15;20(20): 2198-2202, 1995.
 29. Daftari TK, Whitesides TE Jr, Heller JG, et al : Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine*. Apr 15;19(8):904- 11, 1994.
 30. Leblebicioglu-Bekcioglu B, Paulson RB, Paulson JO, et al : Effects of caffeine and nicotine administration on growth and ossification of the ICR mouse fetus. *J Craniofac Genet Dev Biol* Jul-Sep;15(3): 146-56, 1995.
 31. Nash JE, Persaud TV. : Influence of nicotine and caffeine on skeletal development in the rat. *Anat Anz* 168(2): 109-26, 1989.

32. Nociti FH, Nogueira-Filho GR, et al : The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol* Sep;71(9):1460-4, 2000.
33. Luben RA, Wong GL, Cohn DV. : Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells : Provisional identification of osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 99:526-534, 1976.
34. Bancroft JD, Stevens A. : Theory and practice of histological techniques, 3rd edition, Churchill Livingstone, New York 245-267, 1990.
35. Woods B, Kellaway TD. : Cutaneous calculi subepidermal calcified nodules. *Br J Dermatol* 75:1-11, 1963.
36. Dermis D.J. : Clinical dermatology, 22nd revision, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia New York, unit 12-12:1-17, 1995.

Effects of Nicotine on mineralization in human fetal osteoblasts

Sung-Woo Lim, Sang-Heon Han, Seong-Jin Lee, Suk-Joo You, Hyung-Shik Shin, Hyung-Keun You

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Nicotine is one of the major components of cigarette smoking which causes various systemic and local diseases to human body.

The purpose of the present study was to investigate the effects of nicotine on bone mineralization in human fetal osteoblasts cell line(hFOB1). To compare the alkaline phosphatase(ALP) synthesis, hFOB1 were cultured with DMEM/F-12 1:1 Mixture and 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml of nicotine. And to compare the calcium accumulation, hFOB1 cultured for 23 days were quantified and photographed.

ALP activity of hFOB1 exposed to nicotine was not significantly changed at a lower concentrations of nicotine, but was significantly decreased at a higher concentrations (10 µg/ml, 100 µg/ml) of nicotine ($p < 0.05$). A quantified calcium accumulation in hFOB1 was significantly decreased at 1, 10, and 100 µg/ml of nicotine ($p < 0.05$). Significantly decreased calcium deposition was observed at 1, 10, and 100 µg/ml of nicotine.

These results indicate that a higher concentration of nicotine show a negative effects on mineralization of hFOB1.