

흡연자와 비흡연자의 치은섬유아세포에서 니코틴과 NNK가 부착과 성장에 미치는 영향

김일영* · 박미영** · 최성호* · 조규성* · 김종관* · 채중규*

*연세대학교 치과대학 치주과학교실

**연세대학교 치과대학 구강생물학교실

I. 서론

흡연은 인체에 다양한 전신적, 국소적 질환을 유발할 수 있는 위험요소이다. 담배와 그 부산물은 치주 질환을 일으키는 한 요인으로 여겨지나 그 작용은 아직 명확하지 않다. 담배는 니코틴과 nitrosamines, 일산화탄소, hydrogen cyanide 등 수천가지의 다양한 물질로 구성된 혼합물이며 체내에 빠르게 흡수되어 여러 대사 산물로 변화된다. 이러한 성분들은 치주 세포와 면역계 세포 등 다양한 종류의 세포에 부작용을 나타낸다.

Fang 등¹⁾은 니코틴이 세포성장을 방해하며 alkaline phosphatase의 활성도를 증가시킨다고 보고하였다. Mark²⁾의 실험에서 니코틴이 치은섬유아세포의 성장도를 증가시킨다고 보고하였고, David 등³⁾은 니코틴이 오히려 성장을 감소시킨다고 보고하였다. Alpar 등⁴⁾의 치은섬유아세포의 연구에서는 일정 농도 이상에서 의존적 독성효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 흡연중에는 다핵형 백혈구의 생존능이 저하되고^{5, 6)} B-cell과 T-cell의 증식능이 줄어들어 구강 병원균에 대한 면역글로블린의 생산이 제한된다.⁸⁾

Nils 등⁹⁾은 흡연중 발생하는 니코틴과 소량의 Nicotiana alkaloids로부터 형성된 N-Nitrosornicotine(NNN)과 (4-Methylnitrosamino)-1-(3-

pyridyl)-1-butanone(nicotine-derived nitrosamino-ketone: NNK)이 쥐의 폐에 선암과 식도암을 일으키는 것으로 보고하였다. Kawano 등은 NNK가 K-ras 유전자에 돌연변이를 일으키는 흡연의 주된 발암 물질로 보고하였다¹⁰⁾. 흡연은 또한 뇌질환과 심혈관 질환에 매우 강한 상관관계가 있음이 보고되고 있다^{11, 12)}.

또한 임상적으로 흡연은 치태 침착의 양을 증가시키며¹³⁻¹⁶⁾ 치석침착의 핵으로 작용한다고¹⁷⁾ 보고되고 있다. 하지만 다른 연구자들에 의하면 같은 정도의 구강위생을 가진 15세 소년의 흡연자와 비흡연자의 치은염증에 유의성 있는 차이를 발견하지 못하였고¹⁸⁾ Bastiaan¹⁹⁾과 Feldmen 등²⁰⁾ 오히려 치태침착을 줄이는 것으로 보고하고 있다. 그러나 많은 임상가들은 흡연과 치주질환의 발생 및 심도 사이에 강한 상관관계가 있는 것으로 믿고 있다^{21, 22)}.

한편 Preber 등²³⁾은 치주수술후 치주낭 감소가 흡연자에게서 더 적었다고 보고하였고 또한 중성구와 대식세포의 기능 및 T-cell 증식 그리고 세포면역반응의 이상과 관련 있는 것으로 보고되고 있다^{6, 24, 25)}.

따라서 본 연구에서는 담배의 주성분인 nicotine과 NNK를 흡연자와 비흡연자의 치은섬유아세포에 처리하였을 때 그 세포의 부착과 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하기 위해 MTT test로 평가하여 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구재료

(1) 니코틴*

순도 98% 이상의 순수한 니코틴용액을 사용하였으며, 본 실험에선 50ng/ml, 100ng/ml의 농도로 사용하였다.

(2) nicotine-derived nitrosaminoketone (NNK)**

(4-Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone을 0.9% NaCl에 용해시켜 니코틴과 같은 농도의 50ng/ml와 100ng/ml를 사용하였다.

2. 연구방법

(1) 치은섬유아세포의 배양

치주염을 갖고 있지 않은 20년 이상 흡연한 흡연자와 비흡연자의 치은을 $1 \times 1\text{mm}^2$ 크기로 각각 절제하여 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)*에 담아 원심 분리기에서 1000rpm의 속도로 5분간 3회 세척하였다. HBSS를 제거한 후 25cm의 flask내에 1-2ml의 20% fetal bovine serum(FBS)*, 100unit/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.5mg/ml amphotericin-B*가 포함된 α -minimal essential medium(α -MEM)*을 넣고 100%습도, 5% CO₂가 공급되는 37°C 공기혼합배양기*에서 배양하였다. 치은섬유아세포가 조직편으로부터 조직 단층밀생이 형성되면 75cm² 세포배양용 접시를 이용하여 7-10일간 간격으로 계대배양하였다. 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기위해 4-5세대의 세포를 사용하였다.

(2) MTT test

살아있는 세포의 대사활성을 측정하기 위한 방법

으로 MTT(microtiter assay which uses the tetrazolium salt)*를 사용하여 세포증식이나 세포독성을 측정하였다.

Tetrazolium salts는 오직 대사적으로 활성이 있는 세포에 의해서만 절단되므로 살아있는 세포만을 정량할수 있다. MTT test는 succinate dehydrogenase inhibition(SDI)라고 부르며 이러한 SDI실험시 살아있는 세포에 의해 MTT가 환원되어 불용성 formazan salt로 된다. 이 불용성 염기를 용해하여 형성된 formazan을 정량하여 세포 증식이나 세포독성을 측정하는 데 사용한다. 본 연구에서는 96-well에 분주된 세포에 대조군과 니코틴, NNK처리군을 MTT test를 이용하여 530nm에서 세포 흡광도를 측정하였다.

① 치은섬유아세포의 부착도 평가

실험전 96-well plate에 well당 세포가 5000개가 되도록 분주하기 위해, trypsin EDTA를 처리하여 flask 상에서 세포를 떼 후 trypan-blue로 염색하여 hemocytometer에 옮기고 도립현미경 상에서 세포수를 세어 각 well에 분주시켰다.

96-well plate를 반으로 나누어 한쪽 48-well에는 비흡연자의 세포를 분주하여 대조군에는 아무런 처치를 하지않고 처리군에는 50ng/ml, 100ng/ml의 니코틴과 같은 농도의 NNK를 각각 처리하였다. 다른 쪽 48-well에는 흡연자의 세포를 분주하여 같은 방식으로 약물을 처리하였다. 각 plate를 30분, 60분, 90분, 120분, 240분 동안 37°C에서 세포배양을 실시하였다. 시간당 세포 배양 후 배양액을 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)용액 100 μ l을 각 well에 첨가한 후 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. MTT용액을 제거하고 100 μ l의 dimethyl Sulfoxide(DMSO)*를 첨가하여 형성된 formazan을 용해시킨 후 ELISA reader**로 530nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

* : Sigma Chemical Co., Mi., U.S.A.

** : TCR Toronto Research Chemicals Inc.

: Gibco/BRL Scientific Technologies Inc., U.S.A.

\$: Infrared CO₂ incubator, Forma Scientific Inc., U.S.A.

\$\$: Model ETY-96, Toyo instrument Inc., Tokyo, Japan.

② 치은섬유아세포의 성장도 평가

96-well plate에 10000개/well의 세포를 분주하고 하룻밤 부착시킨후 니코틴, NNK을 위와 같은 농도를 처리하고 24시간 후 새 배양액으로 바꾸어 주었다. 그후 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 144시간 간격으로 MTT test를 하고 이때 2일마다 새 배양액으로 바꿔주었다. 또하나의 96-well plate에 10000개/well의 세포를 분주하여 하룻밤 부착시켰다. 그후 니코틴과 NNK를 위와같은 농도를 3회 처리후 24, 48, 72, 96, 144시간 간격으로 MTT test를 하였다.

(4) 통계 분석

각군 사이에 여러 군들 사이에 유의성 있는 차이를 알아보기 위해 비모수 방법인 Mann and Whitney test를 이용하여 통계분석을 하였다.

III. 연구결과

1. 흡연자와 비흡연자 치은섬유아세포의 부착도와 성장도 비교

Figure 1과 Table 1에서 보는 바와 같이 흡연자와 비흡연자 치은섬유아세포는 모두 시간에 따라 부착도가 증가하였다. 부착도의 차이는 비흡연자의 치은섬유아세포의 부착도가 흡연자의 치은섬유아세포의 부착도에 비해 전 시간에 걸쳐 유의성 있게 높게 나타났다. 120분 후 부착도는 plateau를 이루었다 (P<0.05). Figure 2과 Table 2에서 보는 바와 같이 흡연자와 비흡연자의 치은섬유아세포의 성장도 비교에서 비흡연자의 섬유모세포의 성장도가 대부분의 구간에서 흡연자의 치은섬유아세포에 비해 유의성

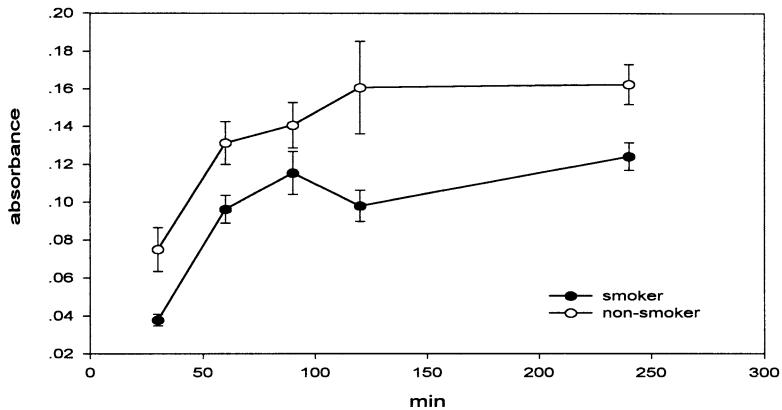


Figure 1. The comparison of attachment between non-smoker and smoker's gingival fibroblast

Table 1. The comparison of attachment between non-smoker and smoker's gingival fibroblast

attachment control	non-smoker	smoker
30 min	0,075±0,011	0,037±0,003*
60 min	0,131±0,011	0,096±0,007*
90 min	0,140±0,012	0,115±0,011*
120 min	0,160±0,024	0,098±0,008*
240 min	0,162±0,010	0,124±0,007*

*: Statistically significant different from non-smoker group(P<0,05)

있게 높게 나타나며 시간이 지남에 따라 그 차이는 점차 커졌다(P<0.05).

2. 흡연자와 비흡연자 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK처리시 부착도에 미치는 영향

비흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK를 각각 50, 100ng/ml 처리시 부착도는 Figure 3과 Table 3에서 보는 바와 같이 처리군이 대조군에 비하여 120분대의 일부 구간을 제외하고는 거의 전구간에서 낮게 나타났고, 유의성 있는 차이를 나타냈다(P<0.05).

흡연자의 치은섬유아세포에 같은 방법으로 처리시 Figure 4와 Table 4에서 보는바와 같이 일부구간에서는 부착도가 유의성있게 낮게 나타났으나 일부 구간에서는 오히려 높게 나타나며 불규칙한 양상을

보였다.

3. 흡연자와 비흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK처리시 성장도에 미치는 영향

비흡연자의 치은섬유아세포의 니코틴과 NNK 50, 100ng/ml를 각각 1회 처리하였을 때 Figure 5와 Table 5에서 보는 바와 같이 초기 24시간대를 제외한 전구간에서 처리군의 성장도가 유의성있게 낮게 나타났다(P<0.05). 흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK 50, 100ng/ml를 1회 처리한 경우에는 Figure 6과 Table 6에서 보는 바와 같이 거의 대부분의 구간에서 유의성있는 차이가 없었으며 불규칙한 양상을 보였다.

비흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK를 50, 100ng/ml 농도로 3회 처리하였을 경우 Figure 7

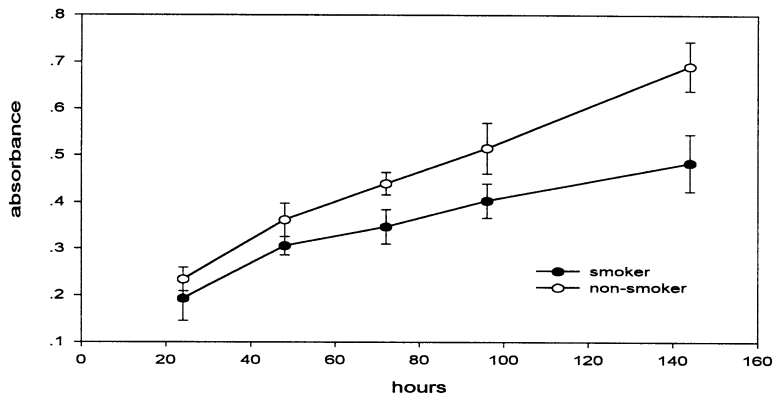


Figure 2. The comparison of growth between non-smoker and smoker's gingival fibroblast

Table 2. The comparison of growth between non-smoker and smoker's gingival fibroblast

growth control	non-smoker	smoker
24 hr	0.213±0.013	0.233±0.030
48 hr	0.332±0.016	0.291±0.015*
72 hr	0.453±0.027	0.316±0.020*
96 hr	0.550±0.029	0.394±0.052*
144 hr	0.728±0.027	0.527±0.031*

*: Statistically significant different from non-smoker group(P<0.05)

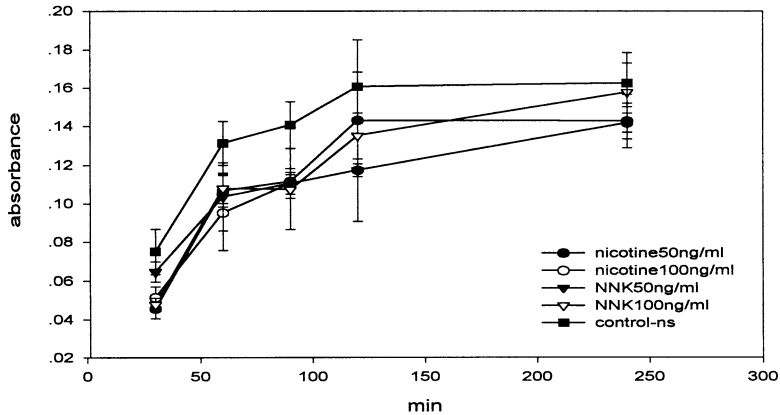


Figure 3. The comparison of non-smoker's gingival fibroblast attachment between treating 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

Table 3. The comparison of non-smoker's gingival fibroblast attachment between treating 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

attachment	non-smoker				
	control	50 ng/ml		100 ng/ml	
		nicotine	NNK	nicotine	NNK
30 min	0.075±0.011	0.045±0.005*	0.064±0.005	0.051±0.005*	0.047±0.003*
60 min	0.131±0.011	0.106±0.008*	0.103±0.017*	0.095±0.019*	0.108±0.007*
90 min	0.140±0.012	0.111±0.003*	0.110±0.005*	0.110±0.007*	0.107±0.020*
120 min	0.160±0.024	0.143±0.025	0.136±0.026	0.117±0.003*	0.135±0.011
240 min	0.162±0.010	0.142±0.013*	0.124±0.005*	0.141±0.008*	0.157±0.020

*: Statistically significant different from control group(P<0.05)

과 Table 7에서 보는 바와 같이 전구간에서 처리군의 성장도가 유의성 있게 낮게 나타났다(P<0.05).

흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK를 50, 100ng/ml 농도로 3회 처리하였을 경우 Figure 8과 Table 8에서 보는 바와 같이 일부 구간을 제외하고는 유의성 있는 차이가 없으며 1회 처리한 결과와 유사하게 불규칙한 양상을 보였다.

IV. 총괄 및 고찰

초기 역학연구에 의하면 흡연과 치주염과의 관계는 흡연습관과 구강위생과의 상관관계로서 흡연자의 건강에 대한 무관심과 낮은 사회경제적 위치로 설명되어졌다^{26, 27}.

그러나 최근 연구에서는 흡연이 치주염에 위험인자(risk marker)일 뿐만 아니라 진성위험요소(true risk factor)라고 주장하고 있다^{13,14,21}. 젊은 연령층에서 치주염의 51-56%는 흡연과 연관이 있고 또 흡연과 치주염은 농도 의존적인 것으로 나타났다²⁸.

또, 흡연은 여러 치주치료시 치유결과에 영향을 미치며 더 나아가 재발성 치주염을 갖는 환자중 흡연자가 높은 비율을 차지하고 있음이 밝혀졌다^{23, 29, 30-32}. 그리고 6년간의 유지치료 후 재평가시 흡연자군의 치유반응이 더 좋지 않았다⁷. 이와 같은 치주질환에 대한 흡연의 영향은 면역학적, 세균학적, 세포학적 측면에서 고려해 볼 수 있다.

면역학적으로 흡연중에는 다형핵 백혈구의 생존능이 저하되고^{5, 6} B-cell과 T-cell의 증식능이 줄어들

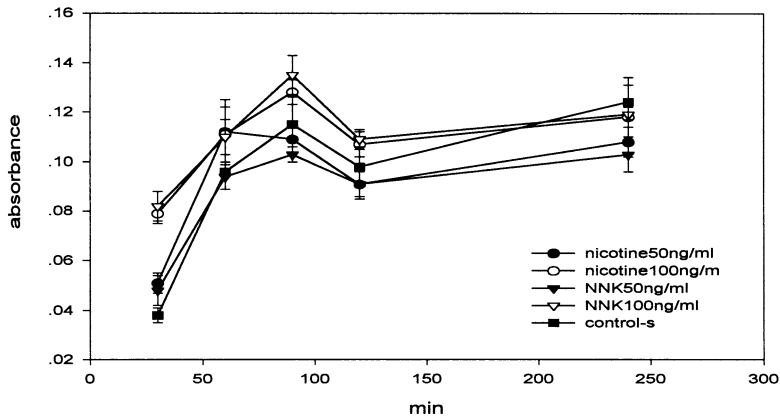


Fig 4. The comparison of smoker's gingival fibroblast attachment between treating 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

Table 4. The comparison of smoker's gingival fibroblast attachment between treating 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

attachment	smoker				
	control	50 ng/ml		100 ng/ml	
		nicotine	NNK	nicotine	NNK
30 min	0,037±0,003	0,050±0,004*	0,047±0,006*	0,078±0,004*	0,081±0,006*
60 min	0,096±0,007	0,111±0,012*	0,094±0,005	0,110±0,011	0,110±0,006*
90 min	0,115±0,011	0,108±0,004	0,103±0,003	0,128±0,004	0,134±0,007*
120 min	0,098±0,008	0,091±0,004	0,091±0,005	0,107±0,004	0,108±0,004*
240 min	0,124±0,007	0,107±0,006*	0,103±0,007*	0,117±0,004	0,118±0,015

*: Statistically significant different from control group(P<0,05)

어 구강 병원균에 대한 면역글로블린의 생산이 제한된다^{7, 8)}. Macfarlane 등³³⁾은 말초혈관의 다형핵 백혈구 기능장애와 난치성 치주염이 연관성을 갖고 있으며, 흡연이 이에 관여함을 보고하였다. Kraal 등은 beagle dog을 대상으로 흡연성분이 함유된 용액을 이용하여 치아주위의 치은으로부터 다형핵 백혈구의 이동이 생체실험이나 시험관 실험에서 흡연성분 용액에 의해 감소 또는 억제됨을 알 수 있었으나, 흡연자와 비흡연자의 타액이나 혈장에 의한 다형핵 백혈구의 화학주성반응에 대한 연구에서는 세포이동 능력에 아무런 영향을 미치지 못한다고 보고하면서 실험 방법이나 조건에 의해 차이가 있을 가능성을 언급하였다^{34, 35)}.

세균학적으로는 치태 침착율과 세균 조성이 흡연자와 비흡연자간에 별 차이 없는 것으로 보이나^{15, 36-38)} 시험관 실험 연구에서는 여러 종류의 구강 및 인두부위에 상주하는 세균을 담배 연기에 노출시켰을 때 대부분 세균에서 흡연의 독성에 의해 수적인 감소를 보이며 이러한 독성반응 가운데서도 그람 음성균이 그람 양성균보다 더 높은 생존율을 보여주었다³⁹⁻⁴¹⁾. 일부 연구자들은 니코틴이 *Actinomyces sp.*를 비롯한 다른 세균종이 협점막 상피와 치아 피막에 부착증가를 시키며 이런 방식으로 흡연자의 치주질환 이환율을 높이는 원인이 될 수 있다고 주장하였다⁴²⁾. 그러나 대체적으로는 흡연에 의한 직접적 세균종의 변화라기 보다는 면역반응의 변화로 인한 이차

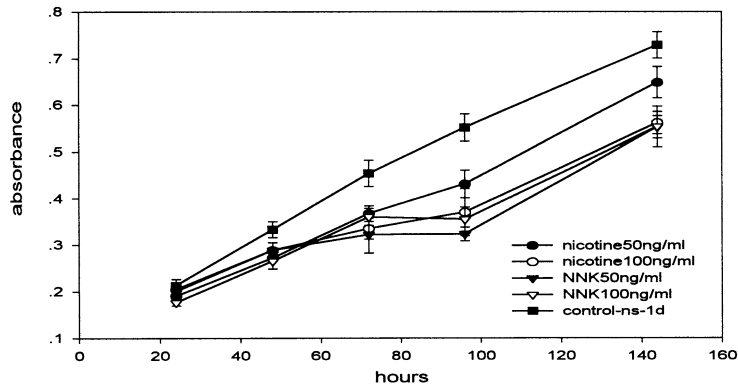


Figure 5. The comparison of non-smoker's gingival fibroblast growth between treating 1 dose of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

Table 5. The comparison of non-smoker's gingival fibroblast growth between treating 1 dose of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

1 dose	non - smoker				
	control	50 ng/ml		100 ng/ml	
		nicotine	NNK	nicotine	NNK
24 hr	0,213±0,013	0,190±0,002*	0,200±0,004	0,205±0,003	0,177±0,006*
48 hr	0,332±0±016	0,271±0,004*	0,287±0,016*	0,287±0,016*	0,265±0,017*
72 hr	0,453±0±027	0,366±0,016*	0,322±0,040*	0,335±0,022*	0,360±0,018*
96 hr	0,550±0±029	0,430±0,030*	0,323±0,014*	0,370±0,051*	0,355±0,026*
144 hr	0,728±0±027	0,648±0,033*	0,551±0,023*	0,561±0,024*	0,553±0,042*

*: Statistically significant different from control group(P<0,05)

적 구강내 세균분포의 변화라고 볼 수 있다.

세포학적 관점에서 니코틴의 세포내 대사과정을 살펴보면 뇌신경세포 세포막과 수용기에 특이적으로 결합하지만^{43, 44} 치은섬유아세포에는 비특이적으로 결합하며⁹ 세포내 공포화를 나타낸다⁴⁵. 치은섬유아세포에서의 니코틴의 대사과정은 4시간 동안 빠르고 지속적으로 흡수되지만, 빠른 흡수속도에 비해 서서히 분해되는 것으로 밝혀졌다⁴⁶.

NNK는 N-nitrosamines의 일종이며⁴⁷ K-ras 유전자에 돌연변이를 일으키는 폐의 주된 발암 물질로 알려져 있다¹⁰. NNK는 접촉되는 장기에 빠르게 흡수되며 원거리 조직에 비해 20배의 농도 흡수를 보이는 site-of entry carcinogen이다⁴⁸. NNK는 간세포나 폐세포 내 과립체의 cytochrome P450라는 효소에

의해 대사되는 것으로 알려졌다^{49, 50}. NNK와 유사한 구조를 가지는 N-nitrosornicotine(NNN)는 구강 상피세포에 비특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있는데⁵¹, 이 사실로 미루어 볼 때 NNK의 흡수과정도 유사하리라고 추정할 수 있다. 그러나, NNK의 흡수 대사와 치은섬유아세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 부족하다.

과거 Mark등²의 연구에서는 일정농도의(0.025 μM)의 니코틴이 치은섬유아세포의 증식을 자극한다고 보고하였고, David³의 연구에서는 그보다 높은농도(0.06mM-5mM)에서 농도 의존적으로 세포 증식이 감소되고 fibronectin의 생산이 감소하는 것으로 보고하였다. 또한 Alpar등⁴의 치은섬유아세포 연구에서는 농도 의존적 독성효과를 나타내는 농도를

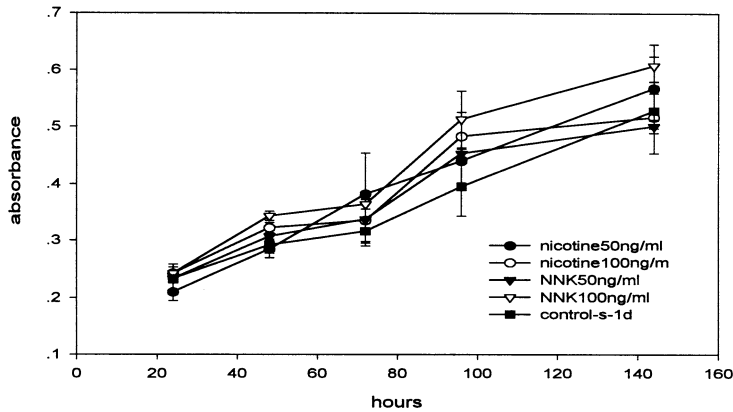


Figure 6. The comparison of smoker's gingival fibroblast growth between treating 1 dose of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

Table 6. The comparison of smoker's gingival fibroblast growth between treating 1 dose of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

1 dose	smoker				
	control	50 ng/ml		100 ng/ml	
		nicotine	NNK	nicotine	NNK
24 hr	0.213±0.013	0.210±0.014	0.232±0.006	0.241±0.016	0.242±0.010
48 hr	0.332±0.016	0.284±0.015	0.306±0.004*	0.322±0.009*	0.343±0.008*
72 hr	0.453±0.027	0.381±0.072*	0.336±0.047	0.335±0.037	0.363±0.008*
96 hr	0.555±0.029	0.440±0.037	0.453±0.088	0.483±0.042*	0.513±0.050*
144 hr	0.728±0.027	0.567±0.057	0.501±0.011	0.517±0.062	0.607±0.038*

*: Statistically significant different from control group(P<0,05)

0.48mM-62mM로 평가하였고 세포 성장도는 7.8mM 이상에서 성장이 줄었다고 보고하였다.

흡연자의 평균 혈장 농도가 50ng/ml이므로^{52,53)} 본 실험에서는 50, 100ng/ml 농도의 니코틴과 NNK를 사용하였다. 과거 연구에서처럼 4-5명의 세포군을 이용한 것이 아니고 흡연자와 비흡연자 각각의 세포를 배양하여 니코틴과 NNK를 처리하였다. Figure 1과 Table 1에서와 같이 각각의 대조군을 비교하였을 때 비흡연자의 부착도와 성장도가 유의성 있게 높게 나타났다. 이는 흡연자와 비흡연자 치은섬유아세포 자체의 부착도와 성장도에 차이가 있다고 생각해 볼 수도 있고, 또다른 관점에서 보면, 세포 공여자 각각의 유전적 차이로 나타난 것일수 있다.

Figure 2, 3과 Table 2, 3에서는 비흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK 처리시 두군 모두 대조군과 유의성있는 부착도의 차이를 보여주고 처리 농도와는 별 차이가 없었다. 반면 흡연자의 치은섬유아세포에서는 유의성 있는 차이를 나타내는 구간은 일부이며 불규칙적이고 대조군과의 차이를 나타내지 못하였다. Figure 5, 6, 7, 8과 Table 5, 6, 7, 8에서 보여주는 성장도의 차이도 부착도와 유사한 결과를 나타내며 비흡연자의 치은섬유아세포에서만 니코틴, NNK 처리시 유의성 있는 차이를 나타냈다.

이러한 결과는 세포 자체의 내성과 관련된 것으로 추정된다. 즉, 흡연자의 치은섬유아세포는 이미 담배 부산물에 장기간 노출되었으므로 이들 물질에 대

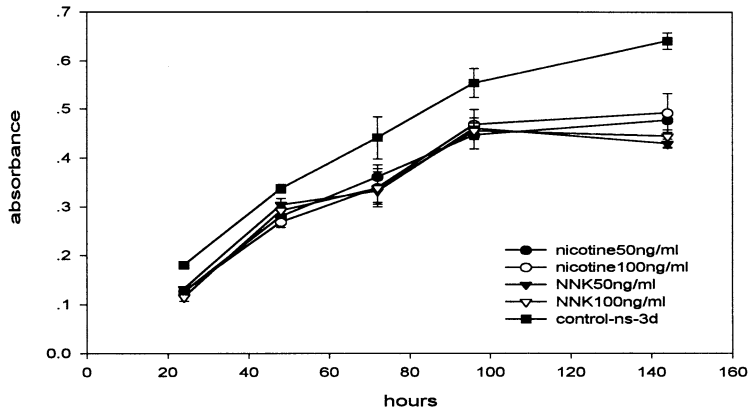


Figure 7. The comparison of non-smoker's gingival fibroblast growth between treating 3 doses of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

Table 7. The comparison of non-smoker's gingival fibroblast growth between treating 3 doses of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

3 dose	smoker				
	control	50 ng/ml		100 ng/ml	
		nicotine	NNK	nicotine	NNK
24 hr	0,180±0,006	0,126±0,001*	0,131±0,005*	0,126±0,007*	0,115±0,007*
48 hr	0,336±0,009	0,280±0,017*	0,303±0,012*	0,268±0,010*	0,292±0,008*
72 hr	0,441±0,042	0,361±0,024*	0,331±0,022*	0,338±0,038*	0,337±0,032*
96 hr	0,554±0,029	0,445±0,027*	0,459±0,022*	0,468±0,030*	0,455±0,016*
144 hr	0,640±0,017	0,477±0,054*	0,429±0,009*	0,492±0,039*	0,443±0,012*

*: Statistically significant different from control group(P<0,05)

한 내성이 유전자 수준과 단백질생성의 과정에 생겨 세포분열과 부착물질분비에 영향을 받지 않는 것으로 추정할수 있다. 이러한 이유로 흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK 처리시 성장도와 부착도가 비흡연자에 비해 별다른 영향을 받지 않는다고 생각할수 있다.

Mark²⁾는 비흡연자 4-5명의 치은섬유아세포군을 이용하여 저농도의 니코틴을 처리시 치은섬유아세포의 증식을 보고하였다. Mark²⁾의 결과를 두고 David^{등³⁾}은 치은섬유아세포의 성장도 증가가 첫째, 저농도의 니코틴을 사용했기 때문이거나, 둘째, 4-5명 치은섬유아세포간의 상호작용으로 인한것이라고 해석하였다. 본 연구에서는 Mark²⁾의 실험과 유사하

게 저농도의 니코틴을 사용하였으나 오히려 처리군의 세포증식의 저하를 보였으므로, 이에 대한 더 많은 연구가 필요하리라고 생각된다.

본 연구 결과에 따르면 흡연자의 치은섬유아세포는 니코틴과 NNK에 대한 내성이 생긴 것으로 추정되고 이는 비흡연자의 치은섬유아세포에서 실험시 니코틴과 NNK가 해로운 영향을 준다는 결과가 더 신뢰할수 있다고 추론할 수 있다.

이상에서 니코틴과 NNK는 치은섬유아세포의 부착도와 성장도를 저하시켰다. 비록 실험실상 배양에 한정되어 있으므로 현 실험 결과를 생체상에 적용할 수는 없으나 치주 조직의 부착과 치유에 문제를 야기시킬수 있다고 추정할 수 있다. 앞으로 흡연의 치

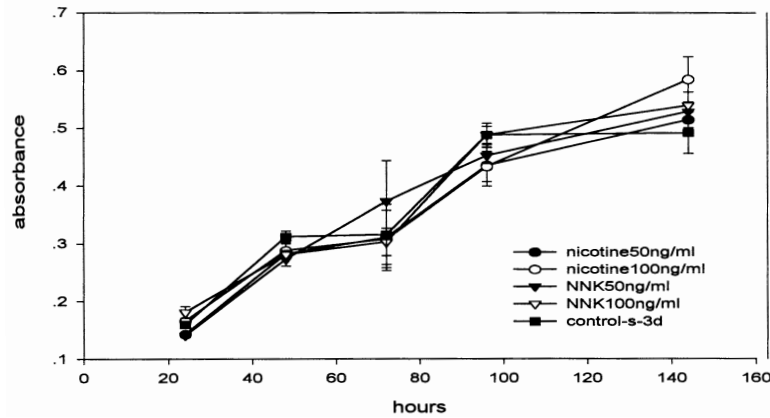


Figure 8. The comparison of smoker's gingival fibroblast growth between treating 3 doses of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

Table 8. The comparison of smoker's gingival fibroblast growth between treating 3 doses of 50 & 100ng/ml of nicotine and NNK respectively

3 dose	smoker				
	control	50 ng/ml		100 ng/ml	
		nicotine	NNK	nicotine	NNK
24 hr	0.160±0.002	0.143±0.003*	0.140±0.002*	0.165±0.003*	0.180±0.009*
48 hr	0.312±0.009	0.282±0.021*	0.273±0.011*	0.287±0.011*	0.281±0.006*
72 hr	0.315±0.051	0.310±0.057	0.373±0.069	0.307±0.049	0.303±0.023
96 hr	0.488±0.021	0.435±0.035*	0.452±0.013*	0.432±0.026*	0.487±0.014
144 hr	0.492±0.035	0.515±0.013	0.529±0.014	0.584±0.039*	0.539±0.022*

*: Statistically significant different from control group(P<0,05)

주조직에 대한 돌연변이성 및 교원질 합성에 관한 유전적 수준의 연구를 통해 흡연과 치주질환과의 관계성 규명을 위한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

V. 결론

치주질환의 원인의 하나로 새롭게 인식되는 흡연이 치주조직에 미치는 영향을 연구하기 위하여 흡연자와 비흡연자의 치은섬유아세포를 각기 배양하여, 이들 세포군에 니코틴과 NNK를 각각 50, 100ng/ml을 처리한 후 각 30분, 60분, 90분, 120분, 240분에서 부착도를 검사하였다. 같은 방법으로 부착 후 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 144시간에서 니코틴과

NNK를 1회 및 3회 처리한 세포군의 성장도를 검사하여 각 시간에 따른 부착도와 성장도를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 흡연자와 비흡연자의 치은섬유아세포의 부착도와 성장도는 비흡연자의 군에서 모든 시간대에 걸쳐 유의성 있게 높게 나타났다(P<0.05).
2. 비흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK 처리하여 부착도와 성장도를 비교하였을 때 처리군이 대부분의 구간에서 유의성 있게 낮게 나타났다(P<0.05).
3. 흡연자의 치은섬유아세포에 니코틴과 NNK 처리하여 부착도와 성장도를 비교하였을 때 그 영

향은 불규칙하게 나타났다.

이상의 결과에서 비흡연자의 치은섬유아세포가 흡연자의 치은섬유아세포보다 부착도와 성장도가 높았고 비흡연자의 치은섬유아세포가 흡연자의 치은섬유아세포보다 니코틴과 NNK에 대한 감수성이 높은 것으로 나타났다. 이로 미루어 니코틴과 NNK는 치은조직의 부착과 성장에 해로운 영향을 준다고 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Fang, M. A., Frost, P. J., Ilda-Klein, A., Hahn, T. J. : Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells, *Bone*, 12:283-286, 1991.
2. Mark, E. P., Donald, E. S., George, S. S., William, A. B., Robert, B. O., Scott, L. S., Thomas, E., Van, D. : The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro, *J Periodontol*, 64:658-665, 1993.
3. David, A. T., Mustafa, K. D. : Effects of Nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro, *J Periodontol*, 66:1056-1064, 1995.
4. Alpar, B., Leyhausen, G., Sapotnick, A., Gunay, H., Geurtsen, W. : Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingiva fibroblast cultures, *Clin Oral Invest*, 2:40-46, 1998.
5. Bridges, R. B., Hsieh, L. : Effect of cigarette smoke fractions on the chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes, *J Leukoc Biol*, 40:73-85, 1986.
6. Kenney, E. B., Kraal, J. H., Saxe, S. R. and Jones, J. : The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes, *J Periodont Res*, 12:227-234, 1977.
7. Barbour, S. E., Nakashima, K., Zhang, J. B., Tangada, S., Hahn, C. L., Schenkein, H. A., Tew, J. G. : Tobacco and smoking: environmental factor that modify the host response(immune system) and have an impact on periodontal health, *Crit Rev Oral Bio Med*, 8:437-460, 1997.
8. Bouclin, R., Landry, R. G., Noreau, G. : The effects of smoking on periodontal structures, *J Can Dent Assoc*, 63:356,360-363, 1997.
9. Nils, K., Abraham, R., Hans, K. D., Dietrich, H. : A study of tobacco carcinogenesis. LIII:carcinogenicity of N-nitrosomnicotine(NNN) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK) in mink(*Mustela vison*), *Cancer Lett*, III:167-171, 1997.
10. Kawano, R., Takeshima, Y., Inai, K. : Effects of K-ras gene mutation in the development of lung lesions induced by 4-(N-methyl-n-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mice, *Jpn J Cancer Res*, 87:44-50, 1996.
11. Abbott, R. D., Yin, Y., Reed, D. M. and Yano, K. : Risk of stroke in male cigarette smokers, *N Engl J Med*, 315:717-720, 1986.
12. Doll, R. and Peto, R. : Mortality in relation to smoking, *Br Med J*, 2:1525-1536, 1976.
13. Bergström, J. : Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease, *Comm Dent Oral Epidemiol*, 17:245-247, 1989.
14. Ismail, A., Burt, B., Edlunk, S. : Epidemiologic pattern of smoking and periodontal disease in the United states, *J Am Dent Assoc*, 106:617-621, 1983.
15. Summers, C. J., Oberman, A. : Association of oral disease with 12 variables : I. Periodontal disease, *J Dent Res*, 47:457-462, 1968.
16. Swenson, H. M. : The effects of cigarette smoking on plaque formation, *J Periodontol*, 50:146-147, 1979.
17. McKendrick, A. J. W., Barbenel, L. M. H.,

- McHugh, W. D. : The influence of time of examination, eating, smoking and frequency of brushing on the oral debris index, *J Periodont Res*, 5:205-207, 1970.
18. Preber, H., Kant, T. : Effect of tobacco smoking on periodontal tissue of 15-year-old school children, *J Periodont Res*, 8:278-283, 1973.
 19. Bastiaan, R. S., Waite, I. M. : Effects of tobacco smoke on plaque development and gingivitis, *J Periodontol*, 49:480-482, 1978.
 20. Feldman, R. S., Bravacos, C. L. : Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes, *J Periodontol*, 54:481-488, 1983.
 21. Bergström, J., Eliasson, S., Preber, H. : Cigarette smoking and periodontal bone loss, *J Periodontol*, 62:242-246, 1991.
 22. Linden, G., Mullally, B. : Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults, *J Periodontol*, 65:718-723, 1998.
 23. Preber, H., Bergström, J. : Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy, *J Clin Periodontol*, 17:324-328, 1990.
 24. Holt, P. G., Keast, D. : Environmentally induced changes in immunological function: Acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals, *Bacteriol Rev*, 41:205-216, 1977.
 25. Nehe, G. H. : Nicotine-induced depression of lymphocyte growth, *Toxicol Appl Pharmacol*, 27:253-258, 1974.
 26. Pindborg, N. : Correlation between consumption of tobacco, ulcero-membraneous gingivitis and calculus, *J Clin Periodontol*, 10:461-463, 1949.
 27. Rivera-Hidalgo, F. : Smoking and periodontal disease, *J Periodontol*, 57:617-624, 1986.
 28. Harber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K., Kent, R. : Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis, *J Periodontol*, 64:16-23, 1993.
 29. Baumert-Ah, M., Johnson, G., Kaldahl, W., Patil, K., Kalkwarf, K. : The effect of smoking on the response to periodontal therapy, *J Clin Periodontol*, 21:91-97, 1994.
 30. Bergström, J., Blomlöf, L. : Tobacco smoking a major risk factor associated with refractory periodontal disease, *J Dent Res*, 71:297, 1992.
 31. Silverstein, P. : Smoking and wound healing, *Am J Med*, 93(suppl):22S-24S, 1992.
 32. Tonetti, M., PiniPrato, G., Cortellini, P. : Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study, *J Clin Periodontol*, 22:229-234, 1995.
 33. Macfarlane, G. D., Herzberg, M. C., Wolff, L. F., Hardie, N. A. : Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking, *J Periodontol*, 63:908-913, 1992.
 34. Kraal, J. H., Chancellor, M. B., Bridges, R. B., Bemis, K. G., Hawke, J. E. : Variation in the gingival polymorphonuclear leukocyte migration rate in dogs induced by chemotactic autologous serum and migration inhibitor from tobacco smoke, *J Periodont Res*, 12:242-249, 1977.
 35. Kraal, J. H., Kenney, E. B. : The response of polymorphonuclear leukocytes to chemotactic stimulation for smokers and non-smoker, *J Periodont Res*, 14:383-389, 1979.
 36. Bergström, J. : Short-term investigation on the influence of cigarette smoking upon plaque accumulation, *Scand J Dent Res*, 89:235-238, 1981.
 37. Coleman, G., Beighton, D., Chalk, A. J., Wake,

- S. : Cigarette smoking and the microbial flora of the mouth, *Aust Dent J*, 21:111-115, 1976.
38. Kenney, E. B., Saxe, S. R., Bowles, R. D., : The effect of cigarette smoking on anaerobiosis in the oral cavity, *J Periodontol*, 46:82-85, 1975.
 39. Bardell, D. : Viability of six species of normal oropharyngeal bacteria after exposure to cigarette smoke in vitro, *Microbios*, 32:7-14, 1981.
 40. Bardell, D., Smith, J. E. : An in vitro study of the exposure of mixed populations of normal oropharyngeal bacteria to cigarette smoke, *Microbios*, 26:159-164, 1979.
 41. Ranchhodjee, H., Saha, B., Babu, J. : Nicotine alters adhesive properties of oral bacteria, *J Dent Res*, 72:325, 1993.
 42. Stoltenberg, J. L., Osborn, J. B., Pilstrom, B. L., Herzberg, M. C., Aeppli, D. M., Wolff, L.F., Fischer, G. E. : Association between cigarette smoking, bacterial pathogen, periodontal status, *J Periodontol*, 64:1225-1230, 1993.
 43. Cairns, N. J., Wonnacott, S. : ³H-Nicotine binding sites in fetal human brain, *Brain Res*, 475:1-7, 1988.
 44. Reavill, C., Jenner, P., Kumar, R., Stoleran, I. P. : High affinity binding of ³H-nicotine to rat brain membranes and its inhibition by analogues of nicotine, *Neuropharmacology*, 27:235-241, 1988.
 45. Raulin, L. A., McPherson, J. C., McQuade, M. J., Hanson, B. S. : The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro, *J Periodontol*, 59:318-325, 1988.
 46. Philip, J. H., Geroge, S. S., Scott, L. : Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts, *J Periodontol*, 62:147-152, 1991.
 47. Weitberg, A. B., Corvese, D. : Effect of vitamin E and beta-carotene on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes, *J Exp Clin Cancer Res*, 16:11-14, 1997.
 48. Gerde, P., Muggenburg, B. A., Stephens, T., Lewis, J. L., Pyon, K. H., Dahl, A. R. ; A relevant dose of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is extensively metabolized and rapidly absorbed in the canine tracheal mucosa, *Cancer Res*, 58:1417-1422, 1998.
 49. Collazo, N. R., Sultatos, L. G. : Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human placental microsome, *Biochem Pharmacol*, 50:1933-1941, 1995.
 50. Smith, T. J., Stoner, G. D., Yang, C. S. : Activation of 4-(N-methyl-n-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung microsomes by cytochromes P450, lipoxygenase, and hydroperoxides, *Cancer Res*, 55:5566-5573, 1995.
 51. Schuster, G. S., Lubas, S., Erbland, J. F., Singh, B. B. : Binding & up-take of N-nitrosornicotine by oral epithelial cells, *J Oral Pathol Med*, 19:114-118, 1990.
 52. Hill, P., Haley, N. J., Wynder, E. L. : Cigarette smoking: Carboxyhemoglobin, plasma nicotine, cotinine and thiocyanate vs self-reported smoking data and cardiovascular disease, *J Chron Dis*, 36:439-449, 1983.
 53. Hill, P., Marquardt, H. : Plasma and urine changes after smoking different brands of ciga-

rettes, Clin Pharmacol Ther, 27:652-657, 1980.