

흡연이 구강병 관련 세균과 Human Papillomavirus의 검출에 미치는 영향

손화경¹⁾, 김주영²⁾, 박정란¹⁾, 김진^{2)*}

백석대학교 치위생학과¹⁾, 연세대학교 치과대학 구강병리학교실 · 구강종양연구소²⁾

〈Abstract〉

The Impact of Smoking in Detection of Bacteria Related to Oral Disease and Human Papillomavirus

Hwa kyung Son¹⁾, Ju Young Kim²⁾, Jeong Ran Park¹⁾, Jin Kim²⁾

Department of Dental Hygiene, Baekseok University Division of Health science, Cheonan, Korea¹⁾,
Department of Oral pathology, Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry²⁾

Smoking is a risk factor for oral leukoplakia and oral cancer, as well as lung cancer, cardiovascular diseases and many other systemic diseases. Smoking is considered increasing factor of some oral diseases involved indigenous bacteria. In addition, a relationship between smoking and infection of Human papillomavirus (HPV), which is associated with oropharyngeal cancer, remains unclear. The aim of this study is to assess whether smoking has an impact on increase of bacteria inducing oral disease such as dental caries and periodontitis, and HPV infection. DNA of saliva gathered from smokers and non-smokers, consisted of men and women, was analyzed using PCR. Oral disease-causing bacteria were more detected in men smokers than men non-smokers and HPV was most found in women non-smokers. Taken together, this study suggests smoking is related with variation of oral microorganism existence in some way.

Key words : Smoking, HPV, *S.mutans*, *P. gingivalis*

I. 서론

흡연은 폐암과 심장질환뿐 아니라, 호흡기감염과 치주질환, 그리고 세균성 수막염과 같은 미생물 감염의 위험요인을 증가시킨다¹⁾. 흡연은 담배연기의 높은 열과 타르, 일산화탄소, 니코틴 등의 해로운 화학물질에 의해 구강병을 일으키는 중요한 위험요인으로서 경조직뿐 아니라 연조직의 손상에 심각한 영향을 주는 것으로 알려져 있다²⁾. 흡연과 치아우식증과의 관계는 논란이 있지만, 보고되어온 많은 연구들에서 흡연이 치아우식증을 증가시키는 중요한 위험요소라는 것을 보여준다^{3,4)}.

또한 흡연은 치주조직에서 염증의 진행과 부착의 소실, 치은 퇴축과 같은 치주병을 일으키는 원인으로 보고되었다⁵⁻⁷⁾. 흡연의 또 다른 위험성은 전암병소인 백반증과 구강암의 유발에 있다^{8,9)}. 흡연은 암억제자인 p53 단백질의 돌연변이를 일으켜서, 손상된 DNA가 세포 내에 축적되어 결과적으로 암의 발생에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다¹⁰⁾. 또한, 흡연은 인체의 면역시스템을 저해하여 다양한 구강병을 일으키는 세균이나 바이러스의 증식에 기여할 수 있다고 알려져 있다¹¹⁾. 최근의 연구에서, 흡연은 비인두체계에서 상재세균의 수를 감소시켜서 병원균의 증가를 야기시킨다고 보고되었다^{12,13)}.

치아우식증을 유발하는 대표적인 미생물인 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 통성 혐기성 그람 양성 세균으로서, 주로 소와 열구의 우식을 유발한다¹⁴⁾. *S. mutans*는 구강 내 상재세균이지만, 특별한 상황에서 기회균으로 전환하여 병을 일으킨다¹⁵⁾. *S. mutans*는 설탕을 젖산으로 대사하면서 생성한

* Correspondence: Jin Kim, Department of Oral Pathology, Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry, 134 Shinchon-Dong, Seoul 120-752, Republic of Korea.

Tel: +82-2-2228-3030, Fax: +82-2-392-2959, E-mail: jink@yuhs.ac

Received: Nov 18, 2013; Revised: Nov 20, 2013; Accepted: Nov 27, 2013

산성 환경을 이용하여 고도로 광화된 범람치질을 부식할 수 있게 만든다¹⁶⁾. *S. mutans*는 또한 설탕을 이용하여 끈적끈적한 다당을 생산하여 치태를 형성하면서 다른 세균들과 함께 응집된다¹⁷⁾.

치주질환과 관련이 깊은 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)는 혐기성 그람음성 병원균으로서 구강뿐 아니라, 위장관과 호흡기, 결장에서도 관찰된다¹⁸⁾. 치주질환에서 보여지는 교원질의 분해는 부분적으로 *P. gingivalis*의 교원질 분해효소에 의한 결과이며, *P. gingivalis*는 사람의 치은 섬유모세포를 침범하며, 상당한 농도의 항생제에서도 살아남을 수 있다¹⁹⁾.

Human papillomavirus (HPV)는 피부의 각질과 점막에만 감염하는 DNA virus이다. 대다수의 알려진 종류의 HPV는 대부분의 사람에서 별다른 증상을 나타내지 않지만, 어떤 종류의 HPV는 사마귀를 일으키거나, 생식기와 구강인두에서 암을 일으킨다. 총 120여 종류 이상의 HPV 중에서 타입 16, 18, 31, 45를 포함한 12개 종류의 HPV는 자궁경부암과 생식기암

을 일으키는 고위험군으로 일컫는다²⁰⁾. 그 중에서 특히 타입 16은 HPV 양성 구강인두암과 관련되어 발견된다²¹⁾. 흡연과 구강의 HPV 감염과의 연관성에 대해서는 많은 논란이 있다. 흡연이 구강에서 HPV 감염의 지속성을 증가시킨다는 보고가 있었고²²⁾, 흡연은 HPV가 감염된 상황에서 두경부 암의 진행을 위한 추가적 위험요인이라는 보고가 있었는가 하면²³⁾, 어떤 연구자들은 두경부에서 흡연과 HPV 감염과의 연관성이 없다고 보고하기도 하였다^{24,25)}.

본 연구는 실제로 흡연이 구강병 유발 세균의 증식과 두경부편평세포암 관련 바이러스의 감염에 영향을 주는 요인인지를 확인하기 위하여 흡연자들과 비흡연자들에서 치아우식증과 치주병을 일으키는 대표적인 세균과 HPV의 DNA를 검출하여 비교함으로써 흡연과 구강질환을 유발시키는 미생물들과의 연관성을 알아보려고 하였다.

Table 1. Nucleotide sequences and 5' positions of PCR primers

GENE		primer sequence	
<i>S. mutans</i>	Forward	5'- TGG	GAC GCA AGG GAA CAC A -3'
	Reverse	5'- GCG	GCG TTG CTC GGT CAG A -3'
<i>P. gingivalis</i>	Forward	5'- CGC	AGC CTA CGA TAA CAT TT -3'
	Reverse	5'- TCC	GTT TTT CTG AAG TTT GC -3'
HPV 16	Forward	5'- ATG TTT CAG GAC CCG CAG GAG CGA	-3'
		5'- TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG TG	-3'

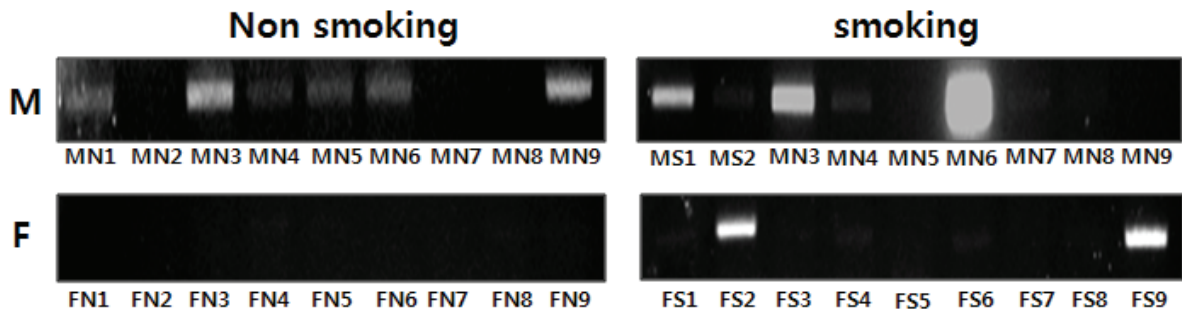


Figure 1. Detection of *S. mutans* DNA in saliva by PCR

Subject's saliva samples are classified according to the presence of smoking and gender. The DNA product was amplified by PCR using AccuPower HotStart PCR PreMix. MN1, 3, 4, 5, 6, 9, MS1, 2, 3, 4, 6, 7 and FS1, 2, 4, 6, 9 are positive for *S. mutans*. M; Male, F; Female, MS Male smoker, MN; Male nonsmoker, FS; Female smoker, FN; Female nonsmoker

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2013년 6월 15일부터 6월 30일까지 천안지역 일부 대학교에 재학 중인 학생들을 대상으로 타액을 채취하여 사용하였다. 대상자로부터 연구 목적에 대한 인지를 확인한 후에 실시하였고, 흡연을 시작한 후 3년 이상 경과된 남녀 흡연자 각 25명과 흡연경험이 없는 남녀 비흡연자 각 25명을 대상으로 하였고, 채취된 타액 중 검출 가능한 농도의 DNA를 함유한 시료만을 선택하여 연구하였다.

2. 연구방법

대상자의 타액으로부터 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 DNA를 추출하였고, AccuPower HotStart PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, South Korea) tube에 DNA 100 ng, forward와 reverse primer를 각

10 pmole씩 첨가하고 멸균된 증류수로 최종 시료의 양이 20 μ l가 되도록 하였다. primer 염기서열은 다음과 같다(Table 1). PCR 조건은 94°C에서 5분간 변성시키고 이어서 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초로 30주기를 순환시킨 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 처리하는 과정을 거쳤다. 모든 PCR 산물은 1% agarose gel로 확인하였다.

3. 통계학적 분석

구강병 유발 세균이나 HPV의 검출비율과 흡연 유무와의 유의성을 검증하기 위해 대표적으로 chi-square test를 시행하였다. 수집된 자료와 측정 값 분석은 SPSS 19.0 (SPSS Inc, IBM, Chicago, USA)을 이용하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

Table 2. Detection of bacteria according to the presence of smoking and gender

	흡연자		비흡연자	
	남(%)	여(%)	남(%)	여(%)
<i>S. mutans</i>	10/15(66.7)	11/19(57.9)	12/22(54.6)	6/19(31.58)
Total	21/34(61.8)		18/41(43.9)	
<i>P. gingivalis</i>	1/15(6.7)	2/19(10.5)	1/22(4.5)	2/19(10.5)
Total	3/34(8.8)		3/41(7.3)	

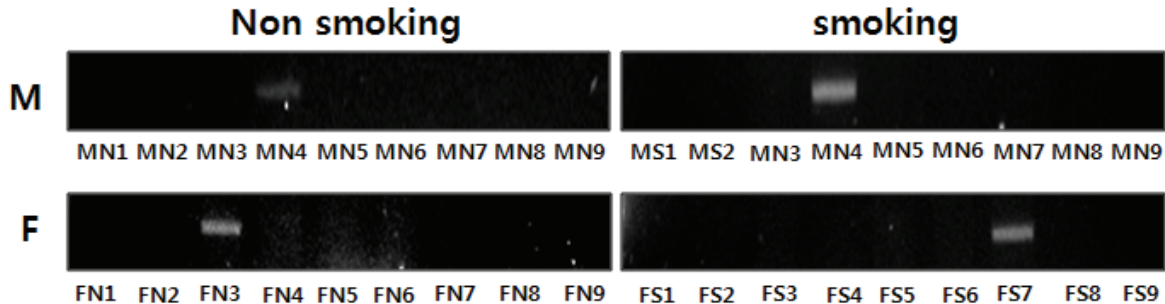


Figure 2. Detection of *P. gingivalis* DNA in saliva by PCR

Subject's saliva samples are classified according to the presence of smoking and gender. The reaction mixture was subjected to 30 cycles of 40 s at 94°C, 40 s at 58°C and 40 s at 72°C. MN4, MS4, FN3 and FS7 are positive for *P. gingivalis*. M; Male, F; Female, MS Male smoker, MN; Male nonsmoker, FS; Female smoker, FN; Female nonsmoker

III. 결과

1. 연구대상자의 일반적 특성

총 100개의 타액 중에서 검출 가능한 농도의 DNA를 함유한 타액을 기증한 연구대상자의 일반적 특성을 빈도분석한 결과, 성별은 남자 49.3%, 여자가 50.7%로 비슷하였다. 흡연 유무를 보면 흡연을 하는 경우는 45.3%, 흡연을 하지 않는 경우는 54.7%였다. 남자 중 흡연자는 40.5%, 비흡연자는 59.5% 이었으며, 여자 중 흡연자는 50%, 비흡연자는 50% 였다. 흡연과 성별에 따른 타액에서의 세균 검출빈도는 다음과 같다(Table 2).

2. 타액에서 *S. mutans*와 흡연과의 관계 분석

본 연구의 대상자들의 타액으로부터 *S. mutans*의 DNA를 검출한 대표적 결과를 Figure 1에 나타내었다. 남자 흡연자의 66.7%와, 여자흡연자의 57.9%에서 *S. mutans*의 DNA가 검출되어, 남자 흡연자가 여자 흡연자보다 검출비율이 약 9%가 높았으며, 남자 비흡연자의 54.6%, 여자 비흡연자의 31.58%에서 *S. mutans*의 DNA가 검출되어, 남자 비흡연자가 여자

비흡연자에 비해 약 23% 높은 검출비율을 나타냈다. 또한 남자 흡연자가 남자 비흡연자에 비해 *S. mutans* DNA의 검출비율이 약12% 높았으며, 여자 흡연자는 여자 비흡연자보다 약 26% 높은 검출비율을 나타냈다. 전체적으로 흡연자는 61.8%에서, 비흡연자는 43.9%에서 *S. mutans*의 DNA가 검출됨으로써, 흡연자는 비흡연자 보다 *S. mutans* DNA의 검출비율이 17.9% 높았다.

3. 타액에서 *P. gingivalis*와 흡연과의 관계 분석

타액에서 *P. gingivalis*의 DNA를 검출한 결과, 남자흡연자가 6.7%, 여자흡연자가 10.5% 였고, 남자 비흡연자가 4.5%, 여자 비흡연자가 10.5% 로서, *S. mutans*의 DNA검출비율에 비해 1/5~1/10 정도의 검출비율을 나타냈지만, *S. mutans*의 DNA검출의 경우처럼 남자흡연자가 남자 비흡연자보다 더 높은 검출비율을 나타내었다. 전체적으로 흡연자는 8.8%, 비흡연자는 7.3%가 검출됨으로써 흡연자가 비흡연자보다 *P. gingivalis*의 DNA의 검출비율이 높았다(Figure 2).

4. 타액에서 HPV 16과 흡연과의 관계 분석

Table 3. Detection of HPV 16 according to the presence of smoking and gender

	남(%)	여(%)	Total(%)
흡연자	5/15(33.3)	2/19(10.5)	7/34(20.6)
비흡연자	8/22(36.4)	10/19(52.6)	18/41((43.9)

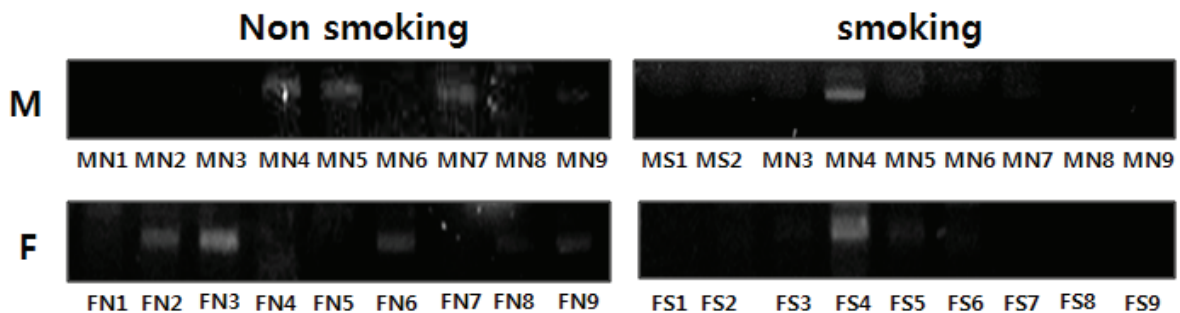


Figure 3. Detection of HPV DNA in saliva by PCR

Subject' s saliva samples are classified according to the presence of smoking and gender, HPV16 DNA was detected by PCR in subject' s saliva. MN4, 5, 7, 9, MS4, FN2, 3, 6, 8, 9 and FS4, 5, 6 are positive for HPV. M; Male, F; Female, MS Male smoker, MN; Male nonsmoker, FS; Female smoker, FN; Female nonsmoker

대상자의 타액에서 검출된 HPV 16을 성별과 흡연여부에 따라 분류하였다(Table 3). 타액에서 HPV16의 DNA 검출유무에 대한 결과는 Figure 3과 같다. HPV 16은 성별에 따른 유의성을 보이지는 않았지만 흡연 여부로 분류하였을 때 비흡연자에서의 검출비율이 흡연자의 검출비율보다 통계학적으로 유의하게 높은 것을 알 수 있었다($p < 0.05$). 성별에 따라 흡연여부를 분류하였을 때에는 남자흡연자와 남자 비흡연자 간에는 유의하지 않았지만 여자 비흡연자가 여자 흡연자보다 HPV 16의 DNA 검출비율이 통계학적으로 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

IV. 고찰

구강병을 일으키는 구강미생물의 증식과 흡연과의 연관성에 관해서 많은 연구가 보고되어왔다. 가장 공통적인 의견은, 흡연이 인체의 면역반응을 저해시켜서 숙주가 다양한 세균과 진균, 바이러스에 쉽게 감염될 수 있다는 것이다²⁶⁾. 그래서 흡연자는 타액의 유출량이 감소하여 저하된 타액의 완충작용은 *lactobacilli*나 *S. mutans*와 같은 치아우식균의 증식을 도울 수 있다²⁷⁾. 또한, 최근의 연구에서, 흡연자의 금연은 치주병원균의 수준을 감소시키면서 치주치료에 따른 미생물의 재집락화의 패턴을 변화시킨다고 보고하였다²⁸⁾. 또 다른 의견은, 담배의 타르성분이 음식물이라는 세균의 영양분과 세균 자신이 구강 내 치아나 치주조직에 오랫동안 붙어서 활동할 수 있는 환경을 만들어 준다는 것이다. 다시 말해서, 타르에 의해 치아나 치주조직에 붙게 된 세균들은 치태 형성을 돕고, 형성된 치태는 수일 내에 집락 특징이 변화되는데, 초기에는 통기성 세균인 치아우식균이 집락하다가 4~5일 이후에는 혐기성 치주질환균이 득세하게 된다. 이후 치태는 타르에 의해 석회작용이 더욱 빨리 진행될 수 있다는 것이다²⁹⁾. 물론 모든 질병의 진행은 개인의 건강과 면역상태에 따라 결과가 달라지겠지만, 본 연구에서는 흡연자체의 발암성분이, 구강병을 유발할 수 있는 잠재성을 가지고 있는 치아우식균과 치주병균이나 HPV를 구강 내에 오래 머물러있게 할 수 있을 것이라는 것에 초점을 맞추고 진행하였기 때문에, 위에서 언급한 흡연과 구강미생물의 증식과 관련된 연구 중 후자의 내용과 관련이 깊다.

본 연구의 Figure 1에서, 남녀 흡연자간, 남녀 비흡연자간에 따른 검출비율의 차이는 구강위생의 관심도의 차이에 기인한다고 생각할 수 있는데, *S. mutans*의 DNA 검출비율이 남자 비흡연자보다 여자흡연자가 더 높았고, 여자비흡연자에 비해 여자흡연자에서 검출비율이 26.3%가 높음으로써 흡연에 의한 타르 등의 발암성분이 *S. mutans*와 결합하여 흡연자의 구강 내에서 *S. mutans*가 더 오래 남아있게 하였을 것으로 생각된다.

*P. gingivalis*는 혐기성 그람음성 세균으로서, 주로 염증성 치주낭에서 균총을 형성하므로 타액에서는 DNA의 검출비율이 낮았지만, 남자흡연자가 남자비흡연자보다 높은 검출비율을 나타냄으로써, *S. mutans* DNA의 검출에서와 유사한 결과를 나타내었다(Figure 2).

미국의 1988년 연구에 따르면 두경부 편평세포암의 75%의 원인이 흡연과 음주에 있다고 보고한 바 있다³⁰⁾. 두경부 편평세포암의 또 다른 위험요인으로서 HPV 16이 있으며, 혈청반응에서 HPV 16 양성 결과는 음성과 비교해서 두경부 편평세포암의 위험요인으로서 약 4배나 높다고 보고되었다³¹⁾. 그러나, 2001년의 한 역학연구는 흡연자나 음주자보다는 비흡연자와 비음주자의 경우에 더욱 HPV 16에 양성인 종양을 갖는다는 결과를 제안하였다³²⁾. 최근의 연구에서, 혈청검사서 HPV 16 양성 인두암의 위험요인의 증가는 비흡연그룹에서 흡연그룹보다 30배 더 높았다는 결과가 있었고, HPV 16이 어떤 방식으로든 흡연의 영향을 막는 것 같다고 보고하였다³³⁾. 본 연구에서는 흡연자보다 비흡연자에서, HPV 16의 검출이 통계적으로 유의하게 높은 결과를 나타내었고, 여자 비흡연자에서 가장 높은 HPV 16의 검출비율을 나타내었다. 본 연구가 대상자의 구강종양과 관련된 HPV 연구는 아니었지만, 흡연자가 비흡연자에 비해 통계학적으로 낮은 HPV 16을 가지고 있다는 것은, 구강세균의 분포와는 반대로, 흡연이 HPV 16의 지속적 감염을 막는 역할을 했다고 볼 수 있다.

본 연구는 대상자의 혈청학적 검사 없이 구강타액에서만 HPV 16을 검출하였기 때문에, 민감도가 떨어지는 결과를 나타낼 수 있다고 할 수도 있겠지만³⁴⁾, HPV항체의 위치는 바이러스에 노출된 위치에 특이성이 없어서 HPV가 호흡기관에 감염되었는지의 여부를 판단할 수가 없기 때문에, HPV의 혈청검사도 HPV의 구강감염과 흡연과 같은 다른 위험요인과의

관계를 판단하는데 있어서 유일한 방법이라고 할 수는 없다³³⁾.

흡연이 구강인두암의 강력한 위험요인임은 중요한 사실이기 때문에, 흡연이 오히려 구강인두암의 또 다른 위험인자인 HPV 16의 감염을 방해한다는 본 연구의 결과는 더욱더 많은 집단에서의 재확인이 필요하며, 대상자에 대한 더욱 더 구체적인 흡연경향과 흡연특성에 대한 연구가 필요하다고 판단되며, 향후 이 연구는 HPV 16 양성 구강인두암의 재발과 대상자의 생존에 있어서 흡연의 역할과 치료의 표적을 결정하는데 있어서 중요한 기초자료가 될 것이라 사료된다.

V. 참고문헌

1. Doll R, Peto R: Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1976; 2:1525-1536.
2. Van Winkelhoff AJ, CJ Bosch-Tijhof, EG Winkel, WA Van der Reijden: Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J. Periodontol* 2001;72:666-671.
3. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J: Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75-year-old individuals. *J Clin Periodontol* 1998;5:297-305.
4. Bruno-Ambrosius K, Swanholm G, Twetman S: Eating habits, smoking and toothbrushing in relation to dental caries: a 3-year study in Swedish female teenagers. *Int J Paediatr Dent* 2005;15:190-196.
5. Genco RJ: Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996;67:1041-1049.
6. Muller HP, Stadermann S, Heinecke A: Gingival recession in smokers and nonsmokers with minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29:129-136.
7. Razali M, Palmer RM, Coward P, Wilson RF: A retrospective study of periodontal disease severity in smokers and non-smokers. *British Dent Journal* 2005;198:495-498.
8. Banoczy J, Gintner Z, Dombi C: Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ* 2001;65:322-327.
9. Williams SA, Kwan SY, Parsons S: Parental smoking practices and caries experience in pre-school children. *Caries Res* 2000;34:117-122.
10. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA: The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000;29:413-425.
11. King TE Jr, Savici D, Campbell PA: Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis* 1988;158:1309-1316.
12. Brook I, AE Gober: Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of smokers and nonsmokers. *Chest* 2005;127:2072-2075.
13. Charlson ES, et al: Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One* 2010;5:e15216.
14. Ikeda T, Sandham HJ: Prevalence of *Streptococcus mutans* on various tooth surfaces in negro children. *Archives of Oral Biology* 1971;16:1237-1240.
15. Nicolas GG, Lavoie MC: *Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque. *Can J Microbiol* 2011;57:1-20.
16. Jeon EH, Han JH, Ahn TY: Comparison of bacterial composition between human saliva and dental unit water system. *J Microbiol* 2007;45:1-5.
17. Mukasa H, Slade HD: Mechanism of Adherence of *Streptococcus mutans* to Smooth Surfaces. *Infect Immun* 1973;8:555-562.
18. Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, et al: Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Res* 2008;15:215-225.
19. Irshad M, van der Reijden WA, Crielaard W, Laine ML: In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule.

- Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2012;60:469-476.
20. Parkin DM: The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006;118:3030-3044.
 21. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al: Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-1956.
 22. Kero K, Rautava J, Syrjänen K, Willberg J, Grenman S, Syrjänen S: Smoking increases oral HPV persistence among men: 7-year follow-up study. *Eur J Clin Microbiol Infect* 2013;13.
 23. Sinha P, Logan HL, Mendenhall WM, Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 2012;33:130-136.
 24. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-720.
 25. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, et al: Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1801-1810.
 26. Mohan Sopori: Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nature Reviews immunology* 2002;2:372-377.
 27. Johnson NW, Bain CA: Tobacco and oral disease. EU-Working Group on Tobacco and Oral Health. *Br Dent J* 2000;189:200-206.
 28. Delima SL, RK McBride, PM Preshaw, PA Heasman, PS Kumar: Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *J Clin Microbiol* 2010;48:2344-2349.
 29. César Neto JB, Rosa EF, Pannuti CM, Romito GA: Smoking and periodontal tissues. a review. *Braz Oral Res* 2012;26:25-31.
 30. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282-3287.
 31. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, et al: Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2007;120:2386-2392.
 32. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM: Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92:805-813.
 33. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, et al: Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1801-1810.
 34. Castle PE: Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1181-1182.

