

니코틴과 PDGF-AB가 배양인체 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

김덕규 · 공영환 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환의 원인론에서 흡연의 역할은 명백하지 않다. 그러나 대부분의 임상가는 담배의 사용과 증가하는 치주질환의 빈도와 심도 사이에는 상관관계가 있다고 보고하고 있다.¹⁻³⁾ Sheiham등⁴⁻⁶⁾은 흡연가에서 치태와 잔사의 축적이 증가됨을 보고했고, Alexander등⁷⁻⁹⁾은 오히려 치태축적의 감소를 보고했다. 그러나 결과적으로, 흡연가는 많은 양의 치석침착을 위한 핵으로 작용하는 높은 빈도의 착색을 보인다는 보고가 우세하다. 또한 흡연은, 뇌혈관계 질환, 심맥관계 질환, 위장관계 질환등의 만성질환을 유발할 수 있는 잠재적인 위험 요소이다. 또한, 만성 치주질환도 흡연과 연관되어 있다는 증거가 축적되고 있다.¹⁰⁻¹³⁾ 실제로 임상적인 증상으로서, 흡연가에서 치주질환의 심도에 비해 최소한의 치은발적과 부종, 전치부와 구치부 설측면으로 깊은 치주낭의 형성, 전치부의 치은퇴축 등이 나타난다고 보고된 바 있다.¹⁴⁾

담배는 니코틴, nitrous amine과 다양한 물질로 구성된 복잡한 혼합물이다. 그러나 이러한 요소들과 치주치료후의 조직 반응에 대한 본질적인 특징은 아직도 불투명하게 남아 있다. 이러한 물질들의 세포성 반응은 매우 다양하

고 담배의 특정요소와 이런 요소들의 양은 매우 밀접한 연관성이 있다.

예를 들면 흡연이 구강내 중성구의 생존 능력, 대식 작용, 화학 주성 능력을 감소시키며, 임파구의 생존력과 증식을 감소시키며, 항체 생성 또한 감소시킨다는 보고가 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾

그러나 담배의 구성요소 중 니코틴만의 효과에 대한 연구는 별로 없다. Fang¹⁹⁾ 등은 니코틴이 세포의 성장을 억제하고 쥐의 골아 유사 세포에서 Alkaline phosphatase활성을 자극한다고 보고했다. 또한 Hanes등²⁰⁾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. 그러나 Peacock등²¹⁾은 다양한 농도의 니코틴의 노출에 따른 부착되는 섬유모세포의 수는 시간이 지남에 따라 일반적으로 증가한다고 보고했다. 또한 Raulin등²²⁾은 세포내로 흡수되는 니코틴은 억제 수준의 농도가 있으며 이 농도 이전까지의 농도에서는 세포 분열의 자극이 있다고 주장했다. 그리고 흡연가에서 혈중 니코틴의 존재하에 치은섬유모세포 및 치주인대세포가 어떤 영향을 받는지에 대한 연구가 있었다.²⁰⁾ 이 연구에 의하면 니코틴

을 섭취하면 정상적인 치은섬유모세포의 기능을 방해할 수 있는 고농도의 니코틴 혈장 농도를 유지한다고 하였다.

최근의 치주치료의 목적이 단순한 치주낭의 제거가 아닌 치주조직의 재생이라는 개념에 근거하면 치근면과 결체조직의 부착은 이러한 치주치료의 목적을 달성하는데 필수적일 것이다.

여기서 이용되는 한 가지 방법이 polypeptide growth factor라고 알려진 분자 집단(molecular group)을 이용한 치주인대세포의 이주, 부착 및 증식의 도입이다. 즉, 치주인대세포가 노출된 치근면으로 이주하여 부착되고 나서 조직화되고 기능적 섬유성기구내로 증식과 성숙을 하게 됨에 따라 골전구세포 또한 치주인대세포의 증식과 함께 성숙이 되도록 한다.

이러한 polypeptide growth factor 중 platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF), transforming growth factor(TGF), 그리고 epidermal growth factor(EGF)등이 치주창상의 치유에 있어 중요한 역할을 담당한다.

이들 polypeptide growth factor 중 가장 널리 연구가 행하여진 platelet-derived growth factor(PDGF)는 약 30,000 Da의 분자량을 가지는 조절 단백질이다.²³⁻²⁶⁾ 이는 2개의 disulfide-bonded polypeptide chain으로 구성되며, homodimer form(PDGF-AA, PDGF-BB)과 heterodimer form(PDGF-AB)으로 분류된다.^{27, 28)} Hart 등²⁶⁾과 Lynch 등³⁰⁾에 따르면 PDGF-AB heterodimer와 PDGF-BB homodimer는 유사한 생물학적 활성과 효능을 갖지만 PDGF-AA homodimer는 다른 범위의 활성도와 더 낮은 효능을 갖는 것으로 보고하였다. 이러한 PDGF는 실험실상 치주인대세포의 활성화에 유의한 증가를 보이며³¹⁾, Blom³²⁾등은 PDGF가 대조군에 비해 최대 274%의 DNA 합성 증진을 보이는 것으로 보고하였다.

이와 같은 PDGF나 니코틴의 단독 투여에

의한 결과들은 나타나 있지만 혼합투여 시의 효과에 대한 연구는 없다. 따라서 본 연구의 목적은 치은섬유모세포와 치주인대세포에 니코틴과 PDGF를 단독 투여하여 이들이 세포의 활성화에 미치는 영향을 실험실적으로 평가하며, 니코틴의 존재 하에 성장 인자의 일종인 PDGF를 투여했을 때 세포들이 어떠한 영향을 받는지를 평가하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 니코틴의 준비

니코틴은 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 혈장 농도가 0.1 μM 이고 경미한 흡연가, 즉 하루에 담배 1-2 개비를 피우는 사람의 평균 니코틴 혈장 농도가 0.025 μM 이기 때문에 본 실험에서는 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μM 의 농도로 준비했다.

2) PDGF의 준비

Human recombinant PDGF-AB(P-6559, Sigma Chemical Company, USA)는 SDS-PAGE에 의해 95% 이상의 순도를 가지며, 이의 생물학적 활성은 ^3H -[thymidine]으로 Swiss 3T3 cell에 대해 평가되었다. 이는 0.01-10ng/ml 범위의 실험에 이용된 농도로 희석하기 위해 사용 직전 10% FBS가 함유된 α -MEM으로 희석하여 사용하였다.

3) 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 배양

본 연구에 사용된 치은섬유모세포 및 치주인대세포는 교정 목적으로 발치한 소구치아 제 3대구치에서 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의

건강 상태는 임상 및 방사선학적으로 평가되었다. 발치한 치아로부터 절제한 치은 조직과 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)으로 3회 세척하였다. 치은 및 치주인대 조직을 세척한 후 60mm 세포배양용 배양접시 (Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다.

세절한 조직은 20분간 37°C 5% CO₂, 습도 100% 배양기 (Bantex 1820 IR, SHELL-LAB, USA)에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 포함한 α -MEM을 가하고 단일세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

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

2. 연구 방법

1) 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

실험 전일 24 well plate에 분주한 치은섬유

모세포와 치주인대세포에 nicotine 0.025, 0.05, 0.1, 0.4 μ M의 농도로 가하고 PDGF를 0.01, 0.1, 1, 5, 10ng/ml를 가했고, 상기 농도의 니코틴과 PDGF를 혼합하여 각각 24시간, 48시간, 72시간 동안 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 배양 후 MTT 용액을 버리고, DMSO를 50 μ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해시킨 후 세포 활성도의 측정을 위해 96 well plate 상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 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.

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

2) 통계 분석

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. 결 과

1. 니코틴이 배양인체 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

니코틴을 단독으로 가한 경우, 실험 1일째 치은섬유모세포군에서 0.025 μ M의 농도에서

92.36±2.71, 0.05µM 농도에서는 87.89±3.19, 0.1µM 농도에서는 85.69±3.79, 0.2µM 농도에서는 86.78±4.49, 0.4µM 농도에서는 89.27±3.67의 활성으로 대조군에 비해 통계학적 유의성을 보이지는 않았으나, 전반적으로 감소된 세포의 활성을 보였다. 그러나 배양 2일째 0.05µM과 0.1µM 농도에서 대조군에 비해 각각 121.28±1.57, 135.78±2.58의 통계학적으로 유의성 있는 활성증가를 나타냈다(P<0.05). 배양 3일째에는 전 농도 모두에서 대조군에 미치지 못하는 세

포의 활성도를 나타냈다.

치주인대세포군은 배양 1일과 2일째 치은섬유모세포군과는 달리 대조군과 비슷한 수준의 활성도를 보였다. 그러나 배양 3일째 0.4µM 농도에서 대조군에 비해 82.09±5.31의 통계학적으로 유의성 있는 활성의 감소를 나타냈다(P<0.05)(Table 1).

2. PDGF가 배양 인체 치은섬유모세포 및 치주인대세포의 활성에 미치는

Table 1. Cellular activities of nicotine at 1st, 2nd and 3rd day (n=4) Mean(%) ± S.D

	GF			PDL		
	1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
Control	100.00±0.91	100.00±2.51 †	100.00±2.91	100.00±4.84	100.00±2.34	100.00±3.17
0.025µM	92.36±2.71	99.77±3.59	98.72±3.21	102.43±3.75	109.94±6.17	90.08±2.58
0.05µM	87.89±3.19	121.38±1.57 †	97.38±2.03	114.12±3.75	116.56±3.36	90.07±1.19
0.1µM	85.69±3.79	135.78±2.58 †	90.07±2.89	110.37±2.07	119.87±5.65	90.17±2.32
0.2µM	86.78±4.49	119.41±1.82	92.65±2.96	100.12±1.40	98.75±2.69	88.71±3.31
0.4µM	89.27±3.67	114.00±2.27	92.02±1.87	97.82±5.69	111.48±4.06	82.09±5.31 †

GF : Gingival fibroblasts

PDL : Periodontal ligament cells

† : Statistically significant different from Control group(P<0.05)

Table 2. Cellular activities of 1st, 2nd and 3rd day (n=4) Mean(%) ± S.D

	GF			PDL		
	1st day	2nd day	3rd day	1st day	2nd day	3rd day
Control	100.00±7.74	100.00±8.92	100.00±8.92	100.00±4.79	100.00±4.36	100.00±4.18
0.01ng/ml	97.74±5.03	101.88±5.15	98.08±5.07	110.90±3.69	102.97±7.01	103.73±2.36
0.1ng/ml	100.94±7.83	104.90±5.59	99.78±4.46	127.78±4.64	99.27±4.10	100.73±2.36
1ng/ml	110.34±2.74	107.13±2.16	118.08±4.00 †	130.86±4.07 †	103.10±3.98	113.17±3.83
5ng/ml	120.48±7.90 †	106.38±3.65 †	111.16±6.59 †	110.68±1.69	106.83±2.69	116.57±1.41 †
10ng/ml	130.56±3.56 †	110.98±2.77 †	112.70±5.17 †	119.70±3.06	111.43±4.06	120.87±5.72 †

GF : Gingival fibroblasts

Periodontal ligament cells

† : Statistically significant different from Control group(P<0.05)

영향

PDGF를 단독으로 가한 경우 치은섬유모세포는 배양 1일째 전 농도 모두에서 대조군에 비해 증가된 세포 활성을 보였고, 특히 5, 10 ng/ml의 농도에서 각각 120.48 ± 7.90 , 130.56 ± 3.56 의 통계학적으로 유의성 있는 세포 활성의 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 배양 2일째에는 10 ng/ml의 농도에서 110.98 ± 2.77 로 통계학적으로 유의성 있는 세포활성의 증가를 보였다 ($P < 0.05$). 그리고 배양 3일째에는 1, 5, 10ng/ml의 농도에서 각각 118.08 ± 4.00 , 111.16 ± 6.59 로 세포 활성의 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$).

치주인대세포군에서는 배양 1일째 1ng/ml의 농도에서 대조군의 최대 130.80 ± 4.07 의 유의한 세포활성의 증가를 보였으며, 배양 2일째에는 대조군과 비슷한 수준의 활성도를 보였다. 배양 3일째에는 10ng/ml의 농도에서 대조군의

최대 120.87 ± 5.72 의 세포활성을 보였고 나머지 농도군에서는 대조군과 비슷한 수준의 세포활성을 보였다(Table 2).

3. Nicotine과 PDGF를 혼합투여시 치은섬유모세포와 치주인대세포의 활성에 미치는 영향

Nicotine과 PDGF를 동시에 투여한 경우 치은섬유모세포에서 배양 1일째에 전농도 모두에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소된 세포활성도를 나타냈다 ($P < 0.05$)(Table 3). 그러나 이러한 양상은 배양 2일째에 반전되어 PDGF 10ng/ml과 Nicotine 0.025 μ M 농도에서 대조군의 최대 123.42 ± 2.55 의 통계학적으로 유의성이 있는 세포활성의 증가를 보였으며($P < 0.05$), 전반적으로 배양 1일군에 비해 거의 대조군 수준으로 회복된 세포의 활성도를 보였

Table 3. Cellular activities of Nicotine and PDGF on Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Cells at 1st day (n=4)
Mean(%) \pm S.D

PDGF(ng/ml) Nicotine(μ M)	GF					PDL				
	0.01	0.1	1	5	10	0.01	0.1	1	5	10
0.025	63.29 \pm 6.61 \ddagger	65.13 \pm 3.31 \ddagger	78.88 \pm 6.90 \ddagger	79.65 \pm 6.61 \ddagger	82.87 \pm 6.66 \ddagger	103.83 \pm 1.53	98.27 \pm 1.73	83.93 \pm 5.12	108.37 \pm 2.09	91.77 \pm 8.91
0.05	79.95 \pm 5.91 \ddagger	66.13 \pm 4.20 \ddagger	67.21 \pm 2.58 \ddagger	82.79 \pm 6.72 \ddagger	60.45 \pm 4.45 \ddagger	97.80 \pm 1.76 \ddagger	116.85 \pm 1.11	121.03 \pm 1.41	123.57 \pm 4.21	88.63 \pm 1.21
0.1	57.22 \pm 6.80 \ddagger	52.99 \pm 2.41 \ddagger	60.91 \pm 5.18 \ddagger	83.56 \pm 7.07 \ddagger	74.81 \pm 9.90 \ddagger	93.60 \pm 2.11	91.77 \pm 2.39	94.67 \pm 1.54	97.67 \pm 1.32	96.57 \pm 5.51
0.2	60.98 \pm 3.57 \ddagger	57.60 \pm 5.09 \ddagger	55.07 \pm 8.90 \ddagger	52.99 \pm 6.81 \ddagger	59.75 \pm 3.20 \ddagger	111.63 \pm 8.99	81.53 \pm 9.17	94.70 \pm 5.72	92.03 \pm 2.76	90.10 \pm 3.28
0.4	51.77 \pm 5.19 \ddagger	61.91 \pm 1.69 \ddagger	68.66 \pm 3.58 \ddagger	68.28 \pm 4.54 \ddagger	74.58 \pm 4.16 \ddagger	85.83 \pm 1.79	83.83 \pm 8.17	90.70 \pm 1.58	108.00 \pm 7.99	102.17 \pm 2.84
control	100.00 \pm 8.79 \ddagger					100.00 \pm 8.53				

\ddagger : statistically significant different from control group($p < 0.05$)

GF : Gingival Fibroblasts

PDL : Periodontal Ligament Cells

Table 4. Cellular activities of Nicotine and PDGF on Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Cells at 1st day (n=4)
Mean(%) ± S.D

PDGF(ng/ml) Nicotine(μM)	GF					PDL				
	0.01	0.1	1	5	10	0.01	0.1	1	5	10
0.025	108.23 ± 5.41	106.58 ± 1.46	97.31 ± 1.17	102.31 ± 9.37	123.31 ± 2.55	94.63 ± 7.24	98.97 ± 2.32	104.67 ± 3.57	95.93 ± 3.19	109.37 ± 1.28
0.05	112.61 ± 7.01	93.46 ± 3.54	89.45 ± 4.02	93.46 ± 4.76	89.97 ± 2.71	91.90 ± 1.33	100.10 ± 3.18	85.70 ± 2.50	107.50 ± 1.37	102.20 ± 7.95
0.1	94.21 ± 6.36	105.40 ± 5.89	89.70 ± 7.91	97.16 ± 4.61	103.61 ± 7.13	89.90 ± 8.49	109.87 ± 1.13	100.83 ± 1.05	101.43 ± 6.25	103.57 ± 1.87
0.2	100.64 ± 6.24	93.14 ± 4.44	104.89 ± 5.46	106.17 ± 4.72	87.38 ± 9.05 ‡	85.03 ± 8.08	96.13 ± 6.87	85.53 ± 1.40	98.10 ± 7.36	103.53 ± 4.20
0.4	91.12 ± 3.16	100.51 ± 7.58	100.13 ± 3.87	102.19 ± 4.24	100.90 ± 3.12	92.00 ± 4.89	105.70 ± 2.43	100.13 ± 8.69	101.70 ± 5.30	100.30 ± 1.50
control	100.00 ± 5.98 ‡					100.00 ± 5.89				

‡ : statistically significant different from control group(p<0.05)

GF : Gingival Fibroblasts PDL : Periodontal Ligament Cells

Table 5. Cellular activities of Nicotine and PDGF on Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Cells at 1st day (n=4)
Mean(%) ± S.D

PDGF(ng/ml) Nicotine(μM)	GF					PDL				
	0.01	0.1	1	5	10	0.01	0.1	1	5	10
0.025	102.17 ± 3.12	105.19 ± 2.71	110.12 ± 1.37	115.27 ± 3.39	121.17 ± 2.54	104.03 ± 1.17	92.57 ± 1.37	97.07 ± 1.10	106.83 ± 1.46+	97.27 ± 8.26
0.05	99.78 ± 3.45	96.43 ± 4.67	90.79 ± 2.17	102.7 ± 2.91	98.72 ± 3.63	118.73 ± 1.85	99.57 ± 1.70	102.67 ± 1.80	99.03 ± 1.60	91.93 ± 8.34
0.1	98.70 ± 1.79	107.89 ± 3.17	118.18 ± 1.58	109.78 ± 4.28	118.08 ± 4.00	116.80 ± 2.55	114.03 ± 7.46	103.40 ± 8.87	97.97 ± 4.80	113.40 ± 1.66
0.2	107.16 ± 2.47	121.71 ± 3.98	119.17 ± 2.59	116.57 ± 1.41	130.70 ± 4.07	99.90 ± 1.86	117.20 ± 2.02	100.33 ± 1.49	103.83 ± 1.64	121.83 ± 2.78
0.4	109.12 ± 2.42+	131.28 ± 2.71+	132.10 ± 2.39+	127.53 ± 3.39+	130.56 ± 3.56+	101.90 ± 9.96+	99.43 ± 7.71+	124.70 ± 1.02+	114.80 ± 9.89+	129.53 ± 9.39+
control	100.00 ± 4.76					100.00 ± 4.73				

‡ : statistically significant different from control group(p<0.05)

GF : Gingival Fibroblasts PDL : Periodontal Ligament Cells

다(Table 4). 한편 배양 3일째에는 PDGF 10ng/ml과 Nicotine 0.2 μ M 농도에서 대조군에 비해 130.70 \pm 4.07의 세포활성도 증가를 보였으며 PDGF 0.1ng/ml 과 Nicotine 0.4 μ M 농도에서 대조군의 131.28 \pm 2.71, PDGF 1ng/ml 과 Nicotine 0.4 μ M 농도에서는 대조군의 132.10 \pm 2.39, PDGF 5ng/ml과 Nicotine 0.4 μ M 농도에서 대조군의 127.53 \pm 3.39, PDGF 10ng/ml과 Nicotine 0.4 μ M농도에서 대조군의 130.56 \pm 3.56의 통계학적 유의성 있는 세포의 활성증가를 보였고(P<0.05), 역시 모든 농도군에서 대조군 수준과 유사하거나 대조군에 비해 증가된 세포활성도를 보였다(Table 5).

치주인대세포군의 경우 배양 1일째에 치은섬유모세포와는 달리 통계학적 유의성은 없으나 전반적으로 대조군과 유사하거나 약간 증가된 세포의 활성을 보였으며 (Table 3), 배양 2일째에도 대조군과 비슷하거나 약간 감소된 세포의 활성도를 보였다. 그리고 배양 2일째에도 통계학적 유의성은 없었다(P<0.05)(Table 4).

치주인대세포군의 배양 3일째에는 전반적으로 대조군과 비슷하거나 약간 증가된 세포의 활성도를 보였으며 PDGF 1ng/ml과 Nicotine 0.4 μ M 농도에서는 대조군의 129.53 \pm 9.39의 통계학적으로 유의성있는 세포활성의 증가를 보였다(P<0.05)(Table 5).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환에 의해 야기되는 치주조직의 파괴의 결과로 일어나는 섬유성 부착기구의 상실에서 치근면으로의 세포의 부착능력은 매우 중요하다. 궁극적으로 가장 이상적인 치주치료의 목적은 치근면에서 상실된 결합조직 재부착의 확립이다.

섬유모세포에 대한 니코틴의 해로운 효과가 많이 주장되어 왔으나^{21, 33)} 치주조직의 결합조직 요소 즉, 치은섬유모세포나 치주인대세포에 대한 니코틴의 효과는 아직도 불투명하게 남

아있다. 그러나 니코틴이 상피를 쉽게 통과한다는 사실과 실험실상 섬유모세포의 기능을 변경시킨다는 점^{24, 35)}으로 미루어 보아 치주질환의 원인에서 니코틴의 잠재적인 역할은 분명하다. 최근의 실험실적 연구에서 Hanes 등²⁰⁾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. 또한 Chamson 등³⁵⁾은 섬유모세포내의 니코틴의 존재는 교원질 합성과 단백질 분비 같은 정상적인 세포의 대사과정을 방해하는 것 같아 보이며 정상적인 창상의 치유반응을 방해하는 것 같다고 보고했다.

본 연구에서 나타난 결과는 니코틴을 단독으로 가한 경우 배양 1일째 치은섬유모세포군에서 통계학적 유의성없이 전반적으로 세포의 활성도 감소가 주목되었다. 반면 치주인대세포군은 통계학적인 유의성은 없으나 대조군과 유사하거나 약간 증가된 세포의 활성도를 나타냈다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포군과 치주인대세포군 모두 대조군에 비해 증가된 세포의 활성도를 보였다. 그리고 배양 3일째 양군의 세포 모두 세포의 활성도 감소가 주목되었다. 이는 대조군에서는 배양기간에 관계없이 일반적으로 세포의 수가 같은 수준인데 반해 24시간후에 니코틴으로 배양한 섬유모세포의 수가 증가하기 시작한다고 보고한 Peacoas 등²¹⁾의 결과와 일치한다.

본 연구에서는 또한 성장인자의 일종인 PDGF를 배양된 치은섬유모세포 및 치주인대세포에 투여하였는데, 선행들의 연구결과에서, Pfeilschifter 등³⁶⁾은 백서의 두개골 배양시 골기질 침착에 대한 PDGF의 효과는 농도 32-320ng/ml의 범위에서 용량의존형 반응을 보인다고 보고했다. 또한 Bryckaert 등³⁷⁾은 PDGF가 골수 섬유모세포의 증식을 최대한 자극했다고 보고했다.

본 연구에서는 치은섬유모세포군이나 치주인대세포군의 전 농도 모두 배양 기간에 따라 점차적으로 활성이 증가하는 경향을 보였다. 특히 배양 1일과 2일째에는 양군 모두 비슷한 양상을 보였으나 배양 3일째에는 치은섬유모세포군에 비해 치주인대세포군에서 유의한 세포활성의 증가를 나타냈다. Blom등³²⁾은 그의 연구에서 PDGF가 1-1000ng/ml의 범위에서 농도의존형으로 세포의 활성을 증가시키며, 최대의 활성은 50ng/ml일 때 274%로 나타났다. 그러나 1-100ng/ml까지는 직선적으로 활성을 증가시키지만 그 이상의 농도에서는 완만한 활성증가를 볼 수 있다고 하였다. 이는 본 실험의 결과와 일치한다.

실제로 담배를 피우는 사람에서 PDGF를 적용했을 때 어떠한 효과가 나타나는지를 알아보기 위해서 니코틴 농도별로 상기 농도의 PDGF를 가한 본 실험에서, 배양 1일째, 치은섬유모세포군은 전 농도 모두 통계학적으로 유의성 있는 세포의 활성도 감소가 주목되었다. 반면 치주인대세포군은 전 농도 모두 대조군과 비슷한 수준의 세포 활성도를 보였다. 이는 초기에 치은섬유모세포는 PDGF 보다 니코틴의 영향을 더 많이 받았다고 추측할 수 있다. 반면 치주인대세포군에서 대조군과 유사한 활성을 보인 것은 니코틴이나 PDGF를 단독으로 투여했을 때와 유사한 양상의 활성을 보였다. 배양 2일째에는 치은섬유모세포나 치주인대세포 양군 모두 대조군 수준과 유사한 세포의 활성도를 보였다. 이는 니코틴 단독 투여군의 경우에서와 마찬가지로 양상을 보였는데 배양 24시간후부터 섬유모세포의 수가 증가하기 시작했다는 Peacock 등²¹⁾의 보고와 일치했다. 한편 배양 3일째에도 역시 양군 모두 대조군과 비슷한 수준이거나 약간 증가된 세포의 활성도를 볼 수 있었다.

본 연구결과에서도 볼 수 있듯이 니코틴과 PDGF의 혼합투여는 치은섬유모세포군에서 배양 1일째 대조군에 훨씬 못미치는 활성을

보였고, 배양 2일째 대조군 수준으로 회복되어 배양 3일째에도 그 수준을 유지하였다. 반면 치주인대세포군에서는 배양 1일, 배양 2일과 배양 3일째 모두 다 대조군 수준과 비슷하거나 약간 증가된 활성을 보인 것과, 치은섬유모세포군에서는 니코틴에 의해 증가된 활성이 배양 3일째에도 그대로 유지되었다는 면에서 배양 3일째의 니코틴에 의한 영향을 PDGF가 회복시켜 주었고, 치주인대세포군은 니코틴에 의한 영향보다는 PDGF에 의한 영향을 더 많이 받았다고 추측할 수 있다.

배양 인체 치은섬유모세포와 치주인대세포를 사용한 대부분의 연구는 아직 초보 단계이고, 실험실상 배양에 한정되어 있기 때문에, 본 실험 결과가 in vivo 상으로 그대로 적용된다고 할수는 없다.

앞으로 이러한 결과들을 종합해 임상에 사용하기전에 몇가지 해결해야 할 문제점이 남아있다. 우선 가장 적절한 농도를 찾는 것이고, 둘째로 어떠한 방법으로 치주조직에 투여할 것이며, 다양한 성장인자간의 상호작용, 혹은 본 실험에서도 보여졌듯이 다른 생체상 가능한 조건을 부여하며 성장인자를 투여하여 그의 효과를 연구하는 것이 필요하리라 생각 된다.

V. 결 론

치은섬유모세포와 치주인대세포에 nicotine 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ M의 농도와 PDGF 0.01, 0.1, 1, 5, 10ng/ml를 가하고, 상기 농도의 니코틴과 PDGF를 혼합하여 각각 24시간, 48시간, 72시간동안 배양하여 세포의 활성도에 어떠한 영향을 미치는지를 결정하기 위해 행한 본 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 니코틴을 단독으로 가한 경우, 치은섬유모세포와 치주인대세포 양군 모두 배양 1일째에는 대조군 수준과 비슷하거나 대

조균 수준에 못 미치는 활성을 보였고, 배양 2일째에는 양군 모두 세포활성이 증가하기 시작했다. 배양 3일째에 양군 모두 대조군 수준으로 회복되거나 약간 감소한 세포의 활성을 보였다.

2. PDGF를 단독으로 가한 경우, 배양 3일째에 치은섬유모세포에 비해 치주인대세포군에서 유의한 세포활성의 증가를 보였다.
3. 니코틴과 PDGF를 동시에 투여한 경우 치은섬유모세포군은 배양 2일째에 니코틴 단독투여군과 비슷한 활성을 보였으며, 배양 3일째에도 이러한 활성의 증가가 유지되었다. 치주인대세포군은 PDGF 단독투여군과 비슷한 세포의 활성을 보였다.

이상과 같은 연구 결과를 종합해 볼 때, 적절한 농도의 PDGF의 사용은 혈중 니코틴이 존재할지라도 치주조직의 치유에 있어 가장 중요한 영향을 미치는 치주인대세포에 선택적으로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Summers CJ, Oberman A.: Association of oral disease with 12 variables: I. Periodontal disease. J Dent Res, 47 : 457-462, 1968.
2. Ismail AI, Morrison EC, Burt BA, Caffese RG, Kavanagh MT.: Natural history of periodontal disease in adults : Findings from the Tecumesh Periodontal Disease Study, 1959-1989. J Dent Res, 69 : 430-435, 1990.
3. Bergstrom J.: Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. Comm Dent Oral Epidemiol, 17 : 245-247, 1989.
4. Sheiham A: Periodontal disease and oral cleanliness in tobacco smokers. J Periodontol, 42 : 259-263, 1971.
5. Brandtzaeg P, Jamison HC.: A Study of periodontal health and oral hygiene in Norwegian army recruits. J Periodontol, 35 : 302-307.
6. Kristoffersen T.: Periodontal conditions in Norwegian soldiers: An epidemiological and experimental study. Scan J Dent Res, 78 : 34-53, 1970
7. Alexander AG.: The relationship between tobacco smoking, calculus, and plaque accumulation and gingivitis. Dent Health, 9 : 6-9, 1970.
8. Bastiaan RJ, Waite IM.: Effects of tobacco smoke on plaque development and gingivitis. J Periodontal, 49 : 480-482, 1978.
9. Feldman RS, Bravacos JS, Rose CL.: Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. J Periodontal, 54 : 481-488, 1983.
10. Preber H, Bergstrom J.: Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. Scan J Dent Res, 94 : 102-108, 1986.
11. Bergstrom J, Floderus-Myrhed B.: Co-tween study on the relationship between smoking and some periodontal disease factors. Community Dent Oral Epidemiol, 11 : 113-116, 1983.
12. Bergstrom J, Ellasson S.: Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. J Periodontal Res. 22 : 513-517, 1987.
13. Rivera-Hidalgo F.: Smoking and periodontal disease. A review of the literature. J Periodontal. 57 : 617-624, 1986.
14. Haber J, Kent RL.: Cigarette smoking in

- a periodontal practice. *J Periodontol*, 63 : 100–106, 1992.
15. 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.
 16. Bridges RB, Hsidi L.: Effect of cigarette smoke fractions on the chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes. *J Leuko Biol*. 40 : 73–85, 1986.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ.: Effects of nicotine on cellular function in UMR 106–01 osteoblast-like cells. *Bone* 12 : 283–286, 1991.
 20. Philip J. Hanes, George S. Schuster, and Scott Lubas: Binding, Uptake, and Release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 62 : 124–152, 1991.
 21. Peacoak ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, Robert B, Scott L, and Thomas E. Van Dyke: The effect of nicotine on repopulation and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 64 : 658–665, 1993.
 22. Raulin LA, McPherson JC, McQuade MJ, Hanson BS.: The effect of nicotine on the attachment of fibroblasts to glass human root surfaces in vitro. *J Periodontol* 59 : 318–325, 1988.
 23. Antoniades HN.: Human platelet-derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation to their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7314–7417, 1981.
 24. Deuel TF, Huang JS, Proffitt RT, Baenzinger JU, Chang D, Kennedy BB.: Human platelet-derived growth factor: Purification and resolution into two active protein fraction. *J Biol Chem* 256 : 8896–8899, 1981.
 25. Heldin CH, Backstrom G, Ostman A et al.: Binding of different dimetric forms of PDGF to human fibroblasts: Evidence for two separate receptor types. *EMBO J* 7 : 1387–1393, 1988.
 26. Raines EW, Ross R.: Platelet-derived growth factor-I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 257 : 5154–5160, 1982.
 27. Antoniades HN, Hunkapiller MW.: Human platelet-derived growth factor(PDGF): Amino terminal amino acid sequence. *Science* 220 : 963–965, 1983.
 28. Hasmmacher A, Hellman U, Johnson A et al.: A major part of purified from human platelet is a heterodimer of one A and one B chain. *J Biol Chem* 263 : 16493–16498, 1988.
 29. Hart CE, Frostrom JW, Kelly JD et al: Two classes of PDGF receptors recognize different isoforms of PDGF. *Science* 240 : 1529–1531, 1988.
 30. Lynch SE, Williams RC, Polson AM et al.: A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*

- 16 : 545-548, 1989.
31. Thomas W. Oates, Cheryl A. Rouse and David L. Cochran.: Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 64 : 142-148, 1993.
 32. Blom S, Holmstrup P, Dabelsteen E.: A comparison of effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cell's DNA synthesis and morphology. *J Periodontol* 65 : 373-378, 1994.
 33. Lilienthal, B, Amerena, V., and Gregory, G.: An epidemiological study of chronic periodontal disease. *Arch Oral Biol* 10 : 553-566, 1965.
 34. Taylor P.: Ganglionic stimulating and blocking agents. In: Goodman LS, Gilman A, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed. New York : Macmillan Company : 218-219, 1985.
 35. 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.
 36. Pfeilschifter J, Oechsner M, Gronwald R, Minne H, Ziegler R.: Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor B. *Endocrinol*, 127 : 69-75, 1990.
 37. Bryckaert MC, Lindroth M, Lischimon A, Tobbelem G, Wasteson A.: Transforming growth factor decrease the proliferation of human bone marrow fibroblasts by inhibiting the platelet-derived growth factor binding. *Exp Cell Res* 179 : 311-321, 1988.

Effects Of Nicotine And PDGF On The Cell Activity Of Human Gingival Fibroblasts And Periodontal Ligament Cells.

Deok - Kyu Kim, Young - Hwan Kong, Hyung - keun You, Hyung - shik shin
Dept. of peridontology, College of Dentistry, Won - kwang University

The ability of fibroblasts attached to teeth is paramount important in re - establishing the lost connective tissue attachment after periodontal therapy. The migration and proliferation of periodontal ligament cells are desired goal of periodontal regeneration therapy. PDGF is well known to regulate the cell activity of mesenchymal origin cell. Tobacco contains a complex mixture of substance including nicotine, various nitrosamines, trace elements, and variety of poorly characterized substances.

Human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells were cultured from extracted tooth for non - periodontal reason. Cultured human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro were treated with PDGF, nicotine in time dependent manner. Cellular activities were determined by MTT assay. The purpose of this study was to determine the effects of Nicotine and PDGF, respectively and the effect of PDGF presence of nicotine on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells.

The results were as follows :

1. In the cell activities of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells were similar or decreased to control value at 1st day. At 2nd day, cellular activities of both group were increased to control value. At 3rd day, cellular activities of both group were returned to the control value.
2. In the cell activities of PDGF on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells, cell activities significantly increase from control group on periodontal ligament cells compared to gingival fibroblast group at 3rd day.
3. In the cell activities of PDGF and nicotine combined application on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells, it seems likely that the nicotinic effect of gingival fibroblasts were higher than periodontal ligament cells and the PDGF effect of periodontal ligament cells were higher than gingival fibroblasts.

This results suggested that PDGF might stimulate the selective growth on periodontal ligament cells.