

Constituents Released from *Streptococcus mutans* Attenuate Arecoline-mediated Cytotoxicity in HGF Cells by Altering Intracellular Ca^{2+} Signaling

Munkhsoyol Erkhembaatar¹, Hyuncheol Oh², and Min Seuk Kim^{1*}

¹Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea,

²College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea

(received February 26, 2014; revised March 13, 2014; accepted March 14, 2014)

Streptococcus mutans (*S. mutans*) is a facultative anaerobic bacterium mainly found in the oral cavity and is known to contribute to tooth decay and gingivitis. Recent studies on intestinal microbiota have revealed that microorganisms forming a biofilm play important roles in maintaining tissue homeostasis through their own metabolism. However, the physiological roles of oral microorganisms such as *S. mutans* are still unclear. In our current study, we identified that constituents released from *S. mutans* (CR) reduce arecoline-mediated cytotoxicity without producing toxic effects themselves. Arecoline, as a major alkaloid of areca nut, is known to mediate cytotoxicity on oral epithelial cells and induces a sustained intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) increase that is cytotoxic. The exposure of human gingival fibroblast (HGF) cells to CR not only inhibited the sustained $[Ca^{2+}]_i$ increase but also the initial $[Ca^{2+}]_i$ elevation. In contrast, CR had no effects on the gene regulation mediated by arecoline. These results demonstrate that *S. mutans* has physiological role in reducing cytotoxicity in HGF cells and may be considered a novel pharmaceutical candidate.

Key words: *Streptococcus mutans*, arecoline, human gingival

*Correspondence to: Min Seuk Kim, PhD, Laboratory of Oral Physiology, School of Dentistry, Wonkwang University 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Republic of Korea
Tel: +82-63-850-6997, Fax: +82-63-364-1085
E-mail: happy1487@wku.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

fibroblast, Ca^{2+} signaling, cytotoxicity

서 론

Streptococcus mutans (*S. mutans*)는 치아우식(dental caries) 및 치주염(periodontitis)의 주 원인균 중 하나로 알려져 있다[1]. 그람양성균 중 하나인 *S. mutans*는 조건적 혐기성(facultative anaerobic) 박테리아로서, 구강 내 치태(dental plaque) 및 치은열구에 주로 서식하며 당(sucrose) 대사를 통한 젖산(lactic acid) 생성과 같은 물질대사를 통해 주변 환경조건을 변화시킴으로써 치아범랑질(dental enamel)부식 및 구강 연조직 내 염증발생과 같은 병리적 활성을 갖는다[2]. 병원성 미생물로서의 역할 외에 *S. mutans*는 구강 내 생체막(biofilm) 형성 초기를 결정함으로써, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Porphyromonas* 등과 같은 다양한 박테리아들의 부착 및 축적을 매개하는 것으로도 알려져 있다[3]. 이렇게 생성된 생체막 내에는 다양한 종류의 박테리아들이 서로간의네트워크를 형성함으로써 구강건강 유지에 중요한 역할을 담당한다는 사실이 보고된 바 있다[4,5]. 장 내 미생물의 경우, 미생물-미생물 간의 상호작용외에 미생물로부터 생성된 대사물질이 주변 조직의 숙주(인체)세포의 생리활성에 작용함으로써 인체 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하고 있음이 잘 알려져 있다[6,7]. 이와 같이, 현재까지 병원성 물질로 알려진 미생물들이 공생미생물(commensal microorganism)로서 인체 항상성 유지를 위한 생리적 기능을 수행하고 있음이 차츰 밝혀지고 있다. 구강 내 미생물 군의 20% 이상을 차지하고 있는 streptococci 군중 가운데, 생체막 형성에 핵심적 역할을 수

행하는 *S. mutans*의 인체세포에 대한 생리적 기능을 규명하는 것이 구강건강을 위해 매우 중요할 것으로 예상된다. 그러나 현재까지 *S. mutans*의 구강 조직 내 숙주세포와의 생리적 작용에 대해서는 많이 연구되고 있지 않다.

아레콜린(arecoline)은 areca nut의 주요 알칼로이드 계 구성성분 중 하나로서, areca nut에는 항정신성 성분이 함유되어 있어 오래 전부터 씹어서 복용되어 왔다. 복용 시 동공확장, 타액분비 증가, 구토, 설사, 치은염 및 치주염의 증상이 나타나며 장기간 복용 할 경우 oral submucous fibrosis (OSF)를 유발하는 것으로 보고되었다 [8,9]. 또한 동물실험 결과, 아레콜린은 세포 성장 및 부착, 콜라겐 합성을 억제하고 세포주기를 G2/M phase에서 억제함으로써 세포독성(cytotoxicity)을 나타내는 것으로 알려져 있다[10,11]. 아레콜린은 또한 무스카린성 수용체(muscarinic receptor)에 대한 효능제(agonist)로 알려져 있으나[12], 구강세포의 세포독성에서의 아레콜린에 의한 무스카린성 수용체 활성이 어떠한 상관관계를 갖는지에 대해서는 아직까지 자세히 보고되지 않고 있다.

무스카린성 수용체는 GPCR (G-protein coupled receptor) 중 하나로, 수용체와 결합되어 있는 G-protein subunit의 타입에 따라 다양한 세포 내 신호전달을 매개하는데, G_{α_q} 활성에 따른 세포 내 칼슘이온의 증가와 G_{α_s} 활성에 따른 세포 내 cAMP 증가, 그리고 G_{α_s} 활성에 의한 세포 내 cAMP의 감소가 그것이다[13,14]. 이 중 세포 내 칼슘이온(Ca^{2+})의 증가는 세포 내 신호전달 과정 중 이차신호전달자(second messenger)로서 신경전달 물질 분비, 근골격근의 수축, 그리고 외분비세포의 분비 등과 같은 매우 다양한 생리활성을 유도한다[15]. 그러나 지속적인 세포 내 칼슘이온의 증가는 강한 세포독성을 유발하는데, 그 예로 담즙산(bile acid)의 역류에 의한 췌장선세포(pancreatic acinar cell) 내 지속적인 칼슘증가는 세포독성을 유도하고 급성 췌장염(acute pancreatitis)의 주 원인이 되는 것으로 보고되었으며[16], M3 수용체의 효능제 중 하나인 필로카핀(pilocarpine)의 지속적인 자극은 세포독성에 의한 타액선조직의 염증반응이 유도됨이 보고된 바 있다[17].

치근섬유 아세포(human gingival fibroblast, HGF)에서 아레콜린에 의한 세포독성 기전에 대해 세포 내 칼슘신호에 근거하여보다 정확히 이해하고, 그 기전에서 *S. mutans*의 공생미생물로서의 생리적 기능에 대해 확인 해 보고자 하였다.

재료 및 방법

HGF (human gingival fibroblast) 세포 배양

HGF-1 세포는 ATCC (CRL-2014)에서 구입하여 사용하였으며 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에

10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin 및 100 IU/ml streptomycin 첨가한 배지에서 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

S. mutans 배양배지 추출물 분획

BHI (Brain heart infusion) 액상배양 배지(성분)에 *S. mutans* 단일 균주(ATCC 25175)을 접종한 뒤 37°C에서 24시간 동안(O.D 1.5) 혐기적 상태에서 배양하였다. 이후 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 *S. mutans* 세포를 제거하고 얻은 상층액(배양액)으로부터 일차 에틸아세테이트(ethyl acetate) 용매를 이용하여 추출물을 분획하고, 나머지 남은 배양액 층으로부터 부탄올(n-butanol) 용매를 이용하여 추출물을 분획하고 농축하였다. 추출된 BESM은 20 mg/ml (DMSO) 농도의 저장액으로 만든 뒤 각 실험에 희석시켜 사용하였다.

세포독성 실험

96 well plate에 HGF세포를 분주하고(1×10^4 /well)하룻밤 동안 세포배양기에서 배양한다. 다음 날 각 well에 지정된 농도의 아레콜린과 BESM를 처리하고 22시간동안 세포배양기에서 배양한 뒤, 제조사(Vybrant® Cytotoxicity assay kit, Molecular probes)에서 제시하는 실험방법에 따라 세포독성을 확인하였다. 배양배지 내에 존재하는 glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)의 활성을 resazurin로부터 생성되는 resorufin 형광(530/590 nm, Ex/Em)을 측정함으로써 세포독성의 정도를 확인하였다.

세포내 칼슘농도($[Ca^{2+}]_i$) 측정

HGF세포를 22 x 22 크기의 커버글라스에 분주한 뒤, 다음 날 실험에 사용하였다. 먼저, 세포배양액 1 ml에 5 μ M의 Fura2/AM (TEFLabs, USA)를 첨가한 뒤 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 이후, 해당 커버글라스는 용액 관류 시스템에 연결되어 있는 챔버에 올려놓고 이후부터 지속적으로 HEPES buffer (mmole/L, 10 HEPES, 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, and 10 glucose, pH7.4, 310 mOsm)를 관류시켜 실험 전 잔류 Fura2를 씻어냈다. 세포 내 칼슘이온의 농도는 340/380 nm dual wavelength를 이용한 excitation과 그로부터 각 각 방출된 형광을 510 nm의 필터를 이용하여 수집하였다. 각 결과는 Ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) 값으로 표시되었다. 각 실험에서 사용된 아레콜린 및 BESM은 HEPES buffer에 목표 농도로 희석되어 세포에 정해진 시간 동안 처리되었다.

RT-PCR

6 well plate에 70~80% confluency로 분주된 HGF세포에

아레콜린 및 BESM을 지정된 농도로 첨가한 뒤 24시간 동안 세포배양기에서 배양하였다. 다음 날 각 각의 세포로부터 totalRNA를 trizol을 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA로부터 oligodT를 이용하여 cDNA를 합성하였으며 각 각의 cDNA로부터 GDF15 (5'-tgcaagtgaccatgtgcatc-3', 5'-gcagtggc-agtctttggcta-3')과 CYP26B1 (5'-cctcctcattgagagcagca-3', 5'-cttgatgacgcagctccagg-3') primer를 이용하여 유전자 발현의 정도를 확인하였다. House-keeping gene으로 GAPDH를 사용하였다.

통계처리

모든 결과는 Student's two-tailed t-test를 통해 분석하였으며 Mean ± SD 값으로 표시되었다. 각각의 결과는 독립된 3 이상의 실험들로부터 얻어졌으며 p 값이 0.05보다 작을 때 유의성 있음을 표시하였다.

실험 결과

Effect of n-butanol extracts from *S. mutans* culture media (BESM) on cytotoxicity in HGF

체 내 박테리아는 스스로의 물질대사를 통해 다양한 대사산물을 주변 환경에 분비함으로써 병리적 활성을 갖는다는 사실은 잘 알려져 있다. 구강조직 세포에 대한 *S. mutans* 대사산물의 병리적 또는 생리적 기능을 규명하기 위하여 *S. mutans* (ATCC 25175) 단일 미생물을 BHI 액상 배지(Brain heart infusion media)에서 24시간동안 배양하고 세포를 제외한 배양배지만을 대상으로 부탄올(n-butanol) 용매를 이용한 추출물(n-butanol extracts from *S. mutans* culture media, BESM)을 얻고 이를 이용하여 HGF 세포에서의 생리적 활성을 확인하고자 하였다. 그에 앞서, HGF 세포에 대한 BESM 자체의 세포독성이 있는지 확인 해 보았다. HGF 세포에 BESM를 농도 별(0, 0.2, 2, 20, 200, 2000 µg/ml)로 처리하고 22시간 이후의 세포독성의 증가를 확인 한 결과, 200 µg/ml이하의 농도(0.2, 2, 20, 200 µg/ml)에서 대조군에 비해 세포독성에 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 1).

BESM attenuates arecoline-mediated cytotoxicity in HGF

2007년 Ko 연구진의 보고에 의하면 아레콜린은HGF 세포에서 농도에 따른 세포독성을 유도하며 결과적으로 구강 내 병리적 원인이 되는 것으로 확인되었다[18]. *S. mutans*로부터 생성된 BESM이 아레콜린에 의한 세포독성에 어떠한 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 자체 독성이 없는 농도(20 µg/ml)로 아레콜린(0, 25, 50, 70, 100, 200

µg/ml)과 함께 HGF 세포에 처리하여 세포독성을 확인하였다. 그 결과, 아레콜린만을 처리한 세포에서는 70 µg/ml의 아레콜린 처리 시 대조군(0 µg/ml arecoline)에 비해 약 1.3배의 세포독성이 증가하고 100 µg/ml의 아레콜린에서 약 1.7배의 세포독성이 증가하는데 비해, BESM을 아레콜린과 동시에 처리할 경우, 70 µg/ml의 아레콜린 만을 처리한 실험군에 비해서 현저하게 낮은 세포독성이 확

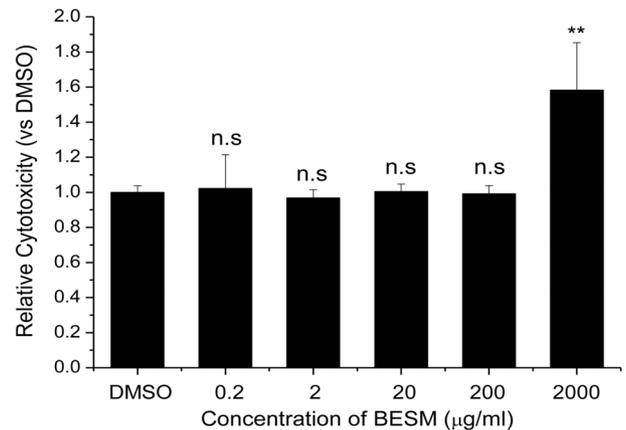


Fig. 1. Effect of BESM on cytotoxicity in HGF. BESM was treated on HGF with indicated concentration for 24 hrs. Cytotoxicity was estimated by measuring the activity of secreted G6PD as described in Material and Methods. As a control group (0 µg/ml), same volume of DMSO was treated. Results were shown as relative value compared to control group (0 µg/ml).

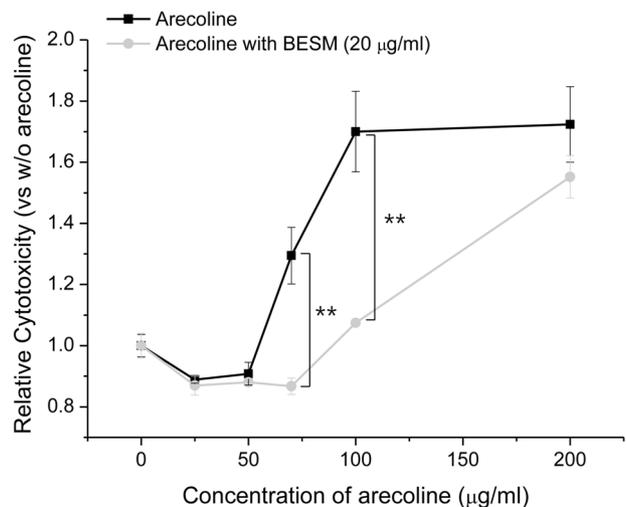


Fig. 2. BESM attenuates arecoline-mediated cytotoxicity in HGF.

HGF cells were incubated for 24 hrs with indicated concentration of arecoline (0, 25, 50, 70, 100, 200 µg/ml) with (grey line) or without BESM (20 µg/ml, black line) line) respectively. Cytotoxicity at each point was calculated as relative to value of cells treated with DW (0 µg/ml arecoline).

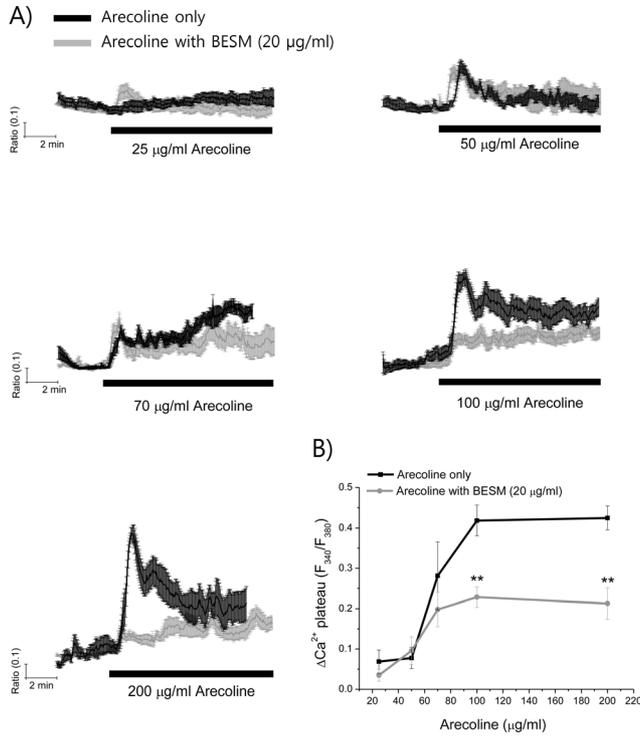


Fig. 3. Effect of BESM on arecoline-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in HGF. Intracellular Ca^{2+} mobilization in HGF cells was measured using Fura-2/AM, fluorescence Ca^{2+} indicator under continuous perfusion with HEPES buffer. (A) Arecoline (25, 50, 70, 100, 200 $\mu g/ml$) with (grey trace) or without BESM (20 $\mu g/ml$, black trace) dissolved in HEPES buffer were then treated for the indicated time. Each trace shows mean of average from three independent experiments with at least 20 cells each. (B) Normalized ΔCa^{2+} plateau shows the $[Ca^{2+}]_i$ level at the plateau and was presented with ratio values (F₃₄₀/F₃₈₀) of each cell.

인되었다(Fig. 2). 흥미롭게도 70 $\mu g/ml$ 의 아레콜린과 BESM을 동시에 처리한 실험군의 세포독성은 대조군(0 $\mu g/ml$ 아레콜린+ 20 $\mu g/ml$ BESM)의 그것에 비해서도 유의성 있게 감소하는 것이 확인되었다(Fig. 2). 이후 BESM과 아레콜린이 동시에 처리된 세포는 100 $\mu g/ml$ 의 아레콜린 농도에서 차츰 세포독성을 나타내다가 200 $\mu g/ml$ 의 아레콜린을 처리한 세포에서는 arecoline만을 처리한 세포와 비슷한 수준으로 세포독성이 증가됨이 관찰되었다 (Fig. 2). 결과적으로, *S. mutans*로부터 생성되어 분비된 물질 중 부탄올 용매에 의해 추출된 성분에 의해 아레콜린에 의한 HGF세포독성이 완화됨을 확인하였다.

BESM treatment alters arecoline-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization.

세포 내 칼슘신호기전은 신경 전달 물질의 분비, 근 수축, 유전자 발현 등과 같이 매우 다양한 세포 생리기능에 반드시 필요하다[19]. 이와는 반대로, 세포 내 지속적인 칼

슘의 증가는 세포독성을 유발하며 염증반응을 일으킨다. 또한, 2009년 Kondaiah 그룹의 보고에 따르면, HaCaT (human keratinocyte) 세포에 저농도의 아레콜린(50 $\mu g/ml$) 자극은 M3 무스카린성 수용체(M-3 muscarinic receptor) 활성화를 통한세포 내 칼슘의 변화를 유도함으로써 TGF β (transforming growth factor-beta 2)의 발현이 증가됨이 관찰되었다[20]. 이를 토대로, 본 연구에서 HGF 세포에서 아레콜린에 의한 독성이 세포 내 칼슘의 증가에 따른 것인지 확인하고, BESM에 의한 세포독성의 감소가 세포 내 칼슘의 변화에 의한 것인지 확인하고자 하였다. 아레콜린에 의한 칼슘농도의 변화를 형광 칼슘 지시자(fluorescence calcium indicator)를 이용하여 HGF 단일세포에서 확인하였다. 앞선 결과에서 세포독성을 나타내지 않는 농도(25, 50 $\mu g/ml$)에서는 BESM의 유무와 상관없이 세포 내 칼슘 농도가 일시적으로 증가한 뒤 바로 제거됨이 확인 되었다 (Fig. 3). 70 $\mu g/ml$ 의 아레콜린 자극은 초기 일시적 칼슘증가는 앞선 저농도의 아레콜린과 비슷한 양상을 보였으나 이후 지속적인 칼슘의 유입을 매개하는 것이 확인되었으며, 고농도의 아레콜린(100, 200 $\mu g/ml$)은 초기 칼슘증가는 물론, 세포질 내 지속적 칼슘 유입을 더욱 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 3). 그러나 위와 같은 아레콜린에 의한 세포 내 지속적 칼슘 유입이, 흥미롭게도, BESM (20 $\mu g/ml$)가 동시에 처리된 세포에서 약 50% 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 3). 또한, 주목할 점은 아레콜린과 BESM이 동시에 처리된 세포에서는 초기의 일시적 칼슘증가가 저농도의 아레콜린에 의한 그것과 비슷하게 유지되었다는 것이다(Fig. 3). 본 결과를 통해 아레콜린에 의한 HGF세포에서의 독성은 세포 내 칼슘의 지속적인 유입에 의해 매개되며, *S. mutans*로부터 생성된 성분이 초기 칼슘 증가 및 지속적 칼슘의 유입을 감소시킴이 확인되었다.

Anticytotoxic effects of BESM is independent with genotoxicity of arecoline

아레콜린은 유전독성 물질로서 HGF 세포에서 DNA repair, TGF-beta signaling, immune response, electrophilic biotransformation 등과 같은 기전에 관여하는 유전자의 발현에 이상을 유도함이 확인되었다[18]. 특히, 아레콜린의 농도증가에 따라 GDF15 (NM_004864.2) 유전자의 발현이 증가되고 CYP26B1 (NM_019885.2) 유전자의 발현이 감소되는 것으로 보고되었는데, 각각은 TGF-beta signaling과 electrophilic biotransformation과정에 관련되어 HGF 세포의 독성을 유발하는 것으로 확인되었다. BESM에 의한 세포 독성 억제효과가 위와 같은 아레콜린의 유전독성에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RT-PCR 기법을 통해 두 유전자의 발현 정도를 확인하였다. HGF 세포에 아레콜린

과 BESM을 각 각 처리하였을 때, Fig. 4에서 보이듯이, BESM는 CYP26B1 및 GDF15 유전자의 발현변화에는 전혀 영향을 미치지 않음이 확인되었다.

고 찰

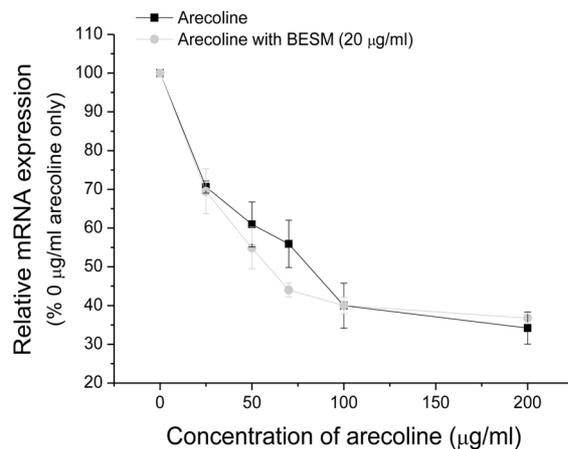
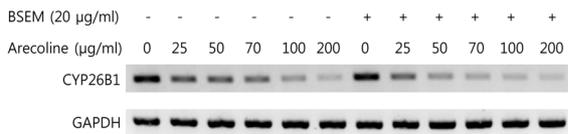
장 내 미생물의 경우, 미생물 스스로의 물질대사를 통해 인체 조직세포와 생리적 상호작용을 하며 결과적으로 조직 항상성 유지에 한 축을 담당함이 여러 차례 보고된 바 있다[7]. 이와 같이 인체 조직 내에서 서식하는 미생물들은 그간 병원성 물질로 알려져 온 것과는 달리 다른 다양한 미생물들과 함께 생체막을 형성하고 그 안에서 네트워크를 형성함으로써 인체 조직의 생리 기능유지에 반드시 필요한 요소임이 점차 확인되고 있다. 그러나 장 내 미생물에 비해, 구강 내 미생물들의 공생미생물로서 생리적 기전에 대해서는 아직 많은 연구가 이뤄지지 않고 있다. 몇몇의 연구보고에 따르면, 건강한 상태의 구강 내에도 700종 이상의 다양한 미생물들이 이미 존재하고 있으며, 치주염과 같은 구강질환의 정도에 따라 미생물 간 중식물에 변화가 있음을 알 수 있다[3,21]. 이러한 보고들은 장 내 미생물과 같이 구강 내 미생물들 역시 병원성 물질

로서의 역할 외에 구강 건강 유지에 중요한 기능을 수행하고 있음을 시사한다.

*S. mutans*에 의해 생성된 대사산물 중 인체 치은세포에 생리적으로 작용하는 물질이 존재할 것이라 가정하고 HGF 세포독성에 그 물질들이 어떠한 생리적 작용을 하는지 확인하였다. 본 연구 결과를 통해 *S. mutans*로부터 생성되고 분비된 물질(BESM) 중에는 HGF세포에 대한 자체의 세포독성은 매우 적은 반면, 아레콜린에 의한 세포독성을 감소시키는 기능의 물질이 존재함이 확인되었다 (Fig. 1 & 2). 또한 아레콜린에 의한 세포 내 칼슘 농도의 지속적 증가 현상이 BESM에 의해 세포독성 감소 정도와 유사하게 감소됨이 확인되었다(Fig. 3). 결과를 종합 해 볼 때, HGF 세포에서 아레콜린에 의한 세포독성 과정에서 세포 내 무분별한 칼슘증가가 그 원인이며 *S. mutans*로부터 생성되어 분비되는 다양한 성분 중에 이러한 칼슘증가를 억제하고, 결과적으로, 아레콜린에 의한 세포독성을 감소시키는 기능의 물질이 존재함을 확인하였다.

본 연구에서 가장 흥미로운 점은, 박테리아 자체의 영향을 배제하고 세포 외부로 분비되는 대사산물의 효과를 확인하기 위해 균집중 이후 일정시간 동안 키운 액상 배지 만을 대상으로 물질을 추출했다는 점이다. 이는, 아레콜린에 의한 칼슘증가 변화 결과를 볼 때, *S. mutans*로

A) CYP26B1



B) GDF15

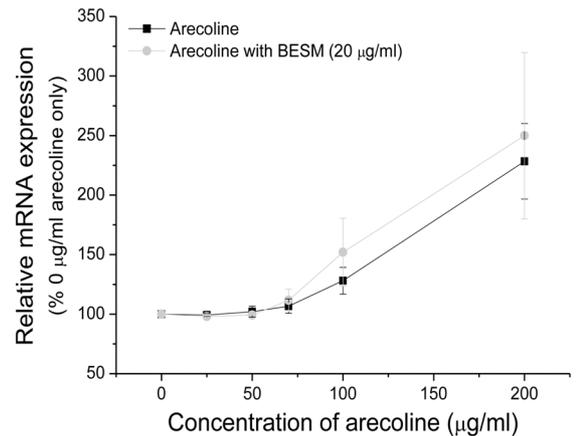
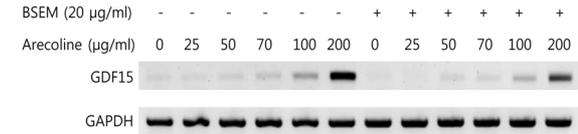


Fig. 4. BESM has no effects on arecoline-mediated genotoxicity.

HGF cells were incubated for 24 hrs under designated condition (arecoline only, black trace; arecoline with BESM, grey trace). Following day, total RNA was prepared from each cell and used as templates for verifying expression level of (A) CYP26B1 and (B) GDF15. Each trace was calculated from three independent experiments and presented the percentage of gene expression relative to the control (% 0 µg/ml arecoline only).

부터 생성되어 세포 외부로 분비되는 물질들 중에는 HGF 세포에서 무스카린성 수용체 활성화에 이은 세포 내 칼슘 신호기전을 조절하는 기능의 특정 성분이 함유되어 있음을 시사한다. 무스카린성 수용체란 GPCR (G-protein coupled receptor) 중 하나로서, 아세틸콜린(acetylcholine)이 대표적 효능제로 알려져 있으며, 수용체 활성화에 의해 신경전달 물질 분비, 근 수축이완, 타액분비와 같은 생리적 활성을 갖는다[22]. 수용체와 결합되어 있는 G protein의 alpha subunit이 $G\alpha_q$ 일 경우, 그림 3에서와 같이, 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가시키고 이하 칼슘 의존적 신호를 전달하는데, 본 연구의 결과와 종합해 볼 때, *S. mutans*로부터 생성되어 분비되는 물질 중 특정 성분이 HGF 세포에서의 아레콜린에 의한 세포독성뿐 아니라 신경세포, 타액선세포, 저작근과 같은 다양한 세포에서의 무스카린성 수용체에 의한 칼슘신호기전을 조절 하고 있을 가능성을 제시하고 있다. 특히, 아레콜린에 의한 HGF 세포 내 칼슘이온 농도 변화에서 BESM에 의한 변화를 보면 아레콜린 단독으로 처리 하였을 때 100 ~ 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 지속적 칼슘농도의 증가(Ca^{2+} plateau) 뿐만 아니라 아레콜린에 의한 초기 칼슘의 증가가 BESM에 의해 사라지는 것을 확인할 수 있다. 이러한 칼슘신호의 두 가지 큰 변화는 *S. mutans*로부터 생성되는 특정 성분이 무스카린성 수용체로부터 IP_3 생성, SERCA 및 PMCA 펌프, 그리고 칼슘 투과 채널까지 다양하게 작용할 수 있음을 시사한다.

마지막으로, 아레콜린은 HGF 세포에서 유전독성(genotoxicity) 물질로 잘 알려져 있는데[10], BESM에 의한 칼슘신호의 변화는 아레콜린의 유전독성과는 관계되지 않음이 확인되었다(Fig. 4). CYP26B1 (Cytochrome P450, family 26, subfamily 26, polypeptide 1)와 GDF15 (Growth differentiation factor 15)는 세포 내 electrophilic biotransformation 및 TGF-beta pathway 과정에 각각 관련된 유전자로서 아레콜린에 의한 세포독성 과정에서 유전자의 발현이 크게 변화되며 세포독성의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[23]. 결과적으로, 70 $\mu\text{g/ml}$ 의 아레콜린 농도에서 BESM에 의해 CYP26B1 유전자의 발현이 18% 정도 감소된 것을 제외하고는 전체적으로 BESM은 아레콜린에 의한 유전자 발현(CYP26B1, GDF15) 변화에는 영향을 미치지 않음이 확인되었는데, 이는 고농도의 아레콜린과 BESM을 동시에 처리한 세포에서 대조군(200 $\mu\text{g/ml}$ arecoline only)의 그것과 거의 비슷한 정도의 독성을 나타내는데 반해, 아레콜린에 의한 세포 내 칼슘농도의 증가가 BESM에 의해 확연히 감소된 상반된 두 결과를 설명하고 있다. 아레콜린에 의한 HGF 세포독성은 세포 내 칼슘농도의 지속적 증가와는 별개로 다양한 경로의 신호전달을 통해서 전달되기 때문인 것으로 짐작된다.

종합해서, *S. mutans*에 의해 생성되고 세포외부로 분비되는 물질 중에는 HGF 세포 내 칼슘신호기전을 조절하고 그로 인해 지속적 칼슘 증가로 인한 세포독성을 억제하는 생리적 기능이 있음이 확인되었다. 또한, 이러한 기능은 아레콜린의 유전독성을 동시에 억제함을 확인하였는데, 이는 *S. mutans*가 구강 내 치은세포와 작용하는 생리적 기능을 수행하고 있음을 증명한다. 앞으로 구강 내 존재하는 다양한 미생물들의 생리적 역할을 확인하는 연구는 구강 건강 증진뿐만 아니라, 기타 다른 조직의 항상성 유지에 새로운 측면을 제시할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50:353-380.
2. Loesche WJ. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease. in *Medical Microbiology*, S. Baron, Editor 1996: Galveston (TX).
3. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005;13:589-595.
4. Jakubovics NS, Gill SR, Vickerman MM, Kolenbrander PE. Role of hydrogen peroxide in competition and cooperation between *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008;66:637-644.
5. Diaz PI. Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities. *Front Oral Biol.* 2012;15:17-40.
6. Kamada N, Nunez G. Regulation of the Immune System by the Resident Intestinal Bacteria. *Gastroenterology* in press.
7. Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(Suppl. 4):9-17.
8. Jeng JH, Tsai CL, Hahn LJ, Yang PJ, Kuo YS, Kuo MY. Arecoline cytotoxicity on human oral mucosal fibroblasts related to cellular thiol and esterase activities. *Food Chem Toxicol.* 1999;37:751-756.
9. Jeng JH, Hahn LJ, Lin BR, Hsieh CC, Chan CP, Chang MC. Effects of areca nut, inflorescence piper beetle extracts and arecoline on cytotoxicity, total and unscheduled DNA

- synthesis in cultured gingival keratinocytes. *J Oral Pathol Med.* 1999;28:64-71.
10. Chang YC, Hu CC, Lii CK, Tai KW, Yang SH, Chou MY. Cytotoxicity and arecoline mechanisms in human gingival fibroblasts in vitro. *Clin Oral Investig.* 2001;5:51-56.
 11. Jeng JH, Lan WH, Hahn LJ, Hsieh CC, Kuo MY. Inhibition of the migration, attachment, spreading, growth and collagen synthesis of human gingival fibroblasts by arecoline, a major areca alkaloid, *in vitro*. *J Oral Pathol Med.* 1996;25:371-75.
 12. Yang YR, Chang KC, Chen CL, Chiu TH. Arecoline excites rat locus coeruleus neurons by activating the M2-muscarinic receptor. *Chin J Physiol.* 2000;43:23-28.
 13. Birnbaumer L. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768:772-793.
 14. Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.* 1999;79:1373-1430.
 15. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998;395:645-648.
 16. Kim MS, Hong JH, Li Q, Shin DM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Muallem S. Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca²⁺ influx and the severity of acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2009;137:1509-1517.
 17. Xu ZP, Yang K, Xu GN, Zhu L, Hou LN, Zhang WH, Chen HZ, Cui YY. Role of M3 mAChR in in vivo and in vitro models of LPS-induced inflammatory response. *Int Immunopharmacol.* 2012;14:320-327.
 18. Chiang SL, Jiang SS, Wang YJ, Chiang HC, Chen PH, Tu HP, Ho KY, Tsai YS, Chang IS, Ko YC. Characterization of arecoline-induced effects on cytotoxicity in normal human gingival fibroblasts by global gene expression profiling. *Toxicol Sci.* 2007;100:66-74.
 19. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:11-21.
 20. Thangjam GS, Agarwal P, Balapure AK, Rao SG, Kondaiah P. Regulation of extracellular matrix genes by arecoline in primary gingival fibroblasts requires epithelial factors. *J Periodontal Res.* 2009;44:736-743.
 21. Wang J, Qi J, Zhao H, He S, Zhang Y, Wei S, Zhao F. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci Rep.* 2013;3:1843.
 22. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des.* 2006;12:3573-3581.
 23. Khan I, Kumar N, Pant I, Narra S, Kondaiah P. Activation of TGF-beta pathway by areca nut constituents: a possible cause of oral submucous fibrosis. *PLoS One* 2012;7:e51806.