# *In Vitro* 에서 Nicotine이 치주인대세포의 Type I collagen, TIMP-1 및 TIMP-2 mRNA 생성변화에 미치는 영향

## ( Nicotine Effect in Human Periodontal Ligament(PDL) cells on the Expressiionm of Type I collagen, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA *In Vitro* )

이화여자대학교 의과대학 치과학교실 **노 준, 전윤식, 김명래**

## Ⅰ. 서론

흡연의 주성분인 니코틴이 인체에 미치는 해로운 영향에 대해서는 이미 널리 알려진 사실이며 특히 니코틴이 구강건강에 미치는 영향에 대한 연구는 주로 치주조직의 파괴나 치유지연 등과 같은 관점에서 진행되어 왔으며 앞으로도 치주질환의 중요한 요인으로 흡연이 관심의 대상이 되고 있다. 흡연과 치주질환과의 관계에 대해 특히 Bergstrom이 많은 임상연구결과를 보고해왔는데 그는 80년대 중반에서부터 90년대 중반에 걸쳐 흡연자와 비흡연자간의 치주질환상태 및 치료후 치유정도를 비교연구한 결과 흡연자에서 더 깊은 치주낭형성 및 치아동요도의 증가[1], 치조골 상실의 심화[2, 3] 치주치료 후 치주낭 깊이의 감소가 비흡연자에 비해 적다는[4, 5] 연구결과 등을 종합하여 흡연이 만성적인 치주조직파괴를 가져올 수 있는 위험요소라고 지적하였다[6].

치주결합조직(periodontal connective tissue)의 주요 구성세포인 섬유아세포가 교원질(collagen)과 세포외적물(extracellular matrix)의 합성과 분해를 할 수 있는 능력과 조직파괴나 골흡수를 자극할 수 있는 cytokine을 생성하므로서 치주조직의 정상적인 대사(normal turnover), 치유(repair), 및 재생(regeneration)에 중요한 역할을 한다고 보고된 바 있으며[7, 8], 섬유아세포를 비롯하여 혈관내피세포(capillary endothelial cell), 대식세포(macrophage)등과 같이 다양한 종류의결합조직세포들이 tissue inhibitors of metalloproteinase(TIMP)를 생성 분비할 수 있다고 보고되고 있다.[9,10,11,12] Kryshtalsky등[13]은 치주조직에서 collagenolytic inhibitor가 결합조직파괴를 억제하는 역할을 하며 건강한 치주조직에서 비교적 높은 농도로 발견된다고 보고하였다. 치주조직의 파괴에 대한 여러가지 기전을 생각해 볼 때 특히 교원질(collagen) 분해에 대해서는 치주조직세포들로부터 생성분비되는 세포외적물질의 작용에 의한 세포외적 경로(extracellular pathway)와 치주조직내 섬유아세포의 거식작용(phagocytosis)에 의해 세포내에서 분해되는 세포내적 경로(intracel lular pathway)로 나누어 볼 수 있겠다.[14] 전자의 경우 특히 metalloproteinase(MPs)와 TIMP의 상관성에 대한 관심이 집중되고 있는데, 항상성 유지를 위한 균형이 파괴되어 MPs의 과잉생산 및 분비 혹은 TIMP의 생성억제 또는 감소로 인한 상대적인 MPs의 증가로 치주조직의 파괴 가능성을 생각해 볼 수 있겠다.

교원질은 결합조직(connective tissue)를 구성하는 주요성분으로 단백질용해효소(porteolytic enzyme)에 의한 비특이성

조직파괴(nonspecific degradation)에 대응하여 조직의 안정성을 유지해주는 구조물로 proteoglycan, elastin, fibronectin과 같은 물질과 연관이 있다.[15] 교원질과 그 분해성분이 화학주성(chemotaxis), 세포증식(proliferation) 또는 세포이동(migration)과 같은 다양한 세포기능에 영향을 주는 것은 물론 세포자체의 형태, 성장 및 분화에도 영향을 주는 것으로 알려져있다.[16,17] 특히 교원질과 관련된 세포형태의 변화는 세포증식의 감소와 연관되어 상처조직의 치유시 섬유아세포의 증식을 억제하므로서 상처조직의 크기를 작게하는 결과를 나타낸다고 보고된 바 있다.[18,19]

결합조직세포는 적절한 환경(physiologic pH)에서 조직내 성분을 파괴하는 MPs의 합성과 분비를 하게되는데,[20] MPs 종류에는 Type I, II, III collagen 을 파괴하는 collagenase와 proteoglycan, laminin 과 fibronectin을 분해하는 stromelysin 및 변성된 교원질과 Type IV collagen을 분해하는 gelatinase가 대표적이다. 동시에 결합조직세포내에서는 이러한 효소의 활동을 억제하는 물질인 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)를 생성 분비하여 MPs활동을 억제하므로써 정상상태에서 생리적 항상성을 유지하게 된다.[21]

TIMP는 28.5kDa의 분자량을 갖는 당단백(glycoprotein)으로 collagenase의 작용을 억제하며 종양세포의 침윤성(invasive potential)과도 역상관관계를 보인다. 즉 TIMP의 감소로 *in vitro* 에서는 침윤성을, *in vivo* 에서는 전이성(metastatic potential)을 보이므로 인해 MPs의 조절과 함께 악성질환의 표현과 연관이 있다.[21]

TIMP-2는 1989년 Stetler-Stevenson등[21,22]에의해 21-kDa분자량의 단백질로 type-IV collagenase proenzyme(70-kDa gelatinase)과 반응하여 이를 억제하는 효과를 갖는 것을 발견하고 이를 TIMP-2라 명명하였다. TIMP-2는 기존의 TIMP(이하 TIMP-1이라 칭함)와 71% 동일한 아미노산 서열을 보이며 주로 gelatinase와 type IV collagen의 활동을 억제하는 특성을 보인다.

본 연구의 목적은 흡연이 치주질환의 원인 또는 위험요소로 치주조직의 파괴나 치유지연과 같은 기전에 관여됨이 많은 임상역학적 및 기초학적 연구결과를 통해 보고되고 있으며 치주조직의 생리 또는 병리작용에 중요한 역할을 하는 치주인대세포를 고려해 볼 때 흡연의 주성분인 니코틴이 치주인대세포의 교원질 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *in vitro* 에서 니코틴 처리된 치주인대세포로부터 분리한 Type I collagen, TIMP-1 및 TIMP-2 mRNA의 변화를 Northern 분석법을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1.세포배양

본 연구에 사용된 사람의 치주인대세포(human PDL cell)는 Dr. Naoki Matsuda(Japan)로 부터 제공 받았으며 실험에 사용된 세포세대는 8에서 13 passages까지 계대배양된 세포들을 주로 사용하였다. 배양용액으로는 non essential amino acid, 10mM sodium pyruvate, MEM vitamines, antibiotic & antimycotic solution이 포함된 Dulbecco's modified eagles medium(DMEM)과 10% fetal bovine serum(FBS)를 사용하였다.

배양조건으로는 37°C, 95% 습도와 5% $CO_2$환경의 배양기에서 100mm 배양접시(Falcon사 제품)를 사용하였으며 배양액은 2일에 한 번씩 교환해주었다. 계대배양(subculture)은 밀생상태(90-95% confluence)에서 0.15% trypsin이 포함된 0.5mM EDTA in Hank's balanced salt 용액으로 2분간 처리하여 trypsinization하였으며 같은 100mm 접시에 1:3 비율로 분할하여 시행하였다.

### 2. Nicotine 처리

사용된 (-)-nicotine은 SIGMA(St. Louis,MO. USA)사 제품으로 실온의 암소에서 보관하였으며 100%인 니코틴 원액은 실험 목적에 따라 순수 에탄올로 희석하여 사용하였다. 실험군은 먼저 배양용액의 혈청용액(FBS)농도를 1%와 10%로 구분한 뒤 각각 0.01%(100ng/ml), 0.1%(1000ng/ml)니코틴 농도로 10% 혈청군에서는 0(control), 4, 8, 12, 24, 48, 96 시간, 1% 혈청군에서는 0, 4, 8, 12, 24시간 처리하였다.

### 3. Total mRNA isolation

각 실험군의 치주인대세포로부터 mRNA 추출을 위해 Guanidium thiocynate을 사용하였으며 과정을 간단히 기술하면 니코틴 처리된 배양액을 제거한 뒤 찬 phosphate buffer

solution(PBS)용액으로 즉시 세척하고 25mM sodium citrate와 β-mercaptoethanol(pH 7.0)이 포함된 4.2M guanidine thiocynate 4ml를 100ml 배양접시에 넣고 충분히 homogenization 시킨 뒤 ultratube에 옮긴다음 25mM acetic acid와 100% ethanol을 넣고 votex를 사용하여 충분히 혼합한 뒤 -20°C에서 다음날까지 침전시킨다. 다음날 ultratube를 4°C에서 9000 rpm으로 15분간 원심분리시킨 뒤 상층부액을 조심스럽게 버리고 튜브바닥에 남아있는 무색투명에 가까운 RNA pellet에 25mM sodium citrate와 5mM Dithiothreitol (DTT: Fisher Biotech)이 포함된 7.5M Guanidium hydrochloride(GuHCl)와 acetic acid 및 100% ethanol을 넣고 충분히 혼합한 뒤 -20°C에서 다음날까지 침전시킨다. 다음날 같은방법으로 원심분리한 후 2일차 1/2분량의 GuHCl을 넣고 RNA pellet을 충분히 용해시킨 뒤 2.0ml tube 에 옮겨 전과 같은 방법으로 -20°C에서 침전시킨다. 다음날 4°C에서 10분간 14000 rpm으로 원심분리한 후 조심스럽게 용액을 따라내고 최종적으로 튜브바닥에 남은 RNA pellet을 FORMAsol(Molecular Research Center, cincinati,OH)에 용해시켜 -20°C에서 보관하였다.

최종적으로 얻어진 RNA의 양(amount)과 순도(purity)를 측정하기위해 각 실험군에서 1ul씩 추출하여 spectrophotometer (SPECTRONIC GENESYS 5)에서 OD(optical density)260/280 nm 값을 측정하였다.

Spetrophotometer를 이용한 RNA양의 결정은 OD 260nm 측정된 값에 희석배율(dilution factor) 과 spectrophotometric conversion( 1A260 unit of single stranded RNA=40ug/ml)값을 곱해주므로써 결과적으로 얻어진 총 RNA양을 계산하였고 순도는 OD 260/280 값이 1.6-1.8 일 때 다른 단백질이나 DNA가 섞이지 않고 비교적 순수하다고 판정하였다.

## 4. Northern Blotting

각실험군에서 15ug씩을 4.0mM 3-(Nmorpholion) propanesulfonic acid, 10mM sodium acetate, 1mM EDTA 및 0.37M formaldehyde가 포함된 1% RNA용 agarous gel에 전기영동시켰다.

전기영동은 0.24-9.5 RNA ladder(GIBCO BRL)와 함께 100Volt로 3시간동안 시행하였으며, 전기영동이 끝난 뒤 RNA ladder는 실험군의 RNA fragement의 크기를 확인하기 위해 분리하여 ethidium bromide로 염색한뒤 U-V light하에서 사진촬영을 하였다(사진1). Gel 속에 전기영동된 각 실험군의 RNA를 Nytran+ membrane(Schleicher & Schull, Keene, NH03431)에 TURBOBLOTTER세트를 이용하여 downward capillary blotting으로 흡착(blotting)시켰으며 2mM N-Laur sarkosine이 포함된 8mM NaOH, 3M NaCl 용액을 Transfer solution으로 사용하였다. 3-4시간의 capillary blotting후 membrane을 중화시키기 위하여 0.5M tris-HCl,pH7.0, 1.5M NaCl용액에 5분간 담가두었다가 membrane에 RNA를 영구고정(fixation)시키기위해 두꺼운 마분지에 membrane을 싸서 80°C에서 20분간 넣어두었다.

고정이 끝난 membrane은 vinyl wrap으로 포장하여 다음 과정인 잡종교배(Hybridization)전까지 냉장보관 하였다.

## 5.DNA Probe and cDNALabelling

본 실험에 사용된 DNA probe는 다음과 같다. Rat type I collagen (insert of 1.6kb, Dr. Sodek) , Mouse TIMP-1(insert of 0.825kb, Dr. Overall), Mouse TIMP-2(insert of 0.7kb, Dr. Overall), human GAPDH(insert of 1.4kb, Dr P. Bradford).

각 cDNA probe는 DECA prime DNA labeling kit(Ambion Inc. Austin Texas)를 사용하여 ($\alpha$-$^{32}$P)-dCTP(>3,000Ci/mmol, Du Pont NEN Reseach Products, Boston MA)으로 labelling하였으며 labeling specific activity 를 확인하기위하여 Liquid scintilating counter를 이용하여 β-counting을 시행하였다.

## 6. 잡종교배와 자가방사선 기록(Hybridization and Autoradiograph)

RNA가 흡착 고정된 membrane의 Hybridization은 미리 만들어 놓은 Hybridization 용액(50% formamide, 5XDenhardt's reagent, 0.5% SDS, 5XSSPE with 100ug/ml denatured salmon sperm DNA)과 함께 Hybaid mini hybridization oven(Labnet, Woodbridge NJ)을 이용하여 42°C 에서 밤새 시행하였다.

Hybridization이 끝난 후 radioactive한 membrane을 SSPE와 SDS용액으로 42°C에서 단계적으로 SDS용액 농도와 온도를 높여 주면서 세척해 주었으며 세척이 끝난 후 FUJI X-ray

film을 사용하여 -70°C에서 자가방사선기록법(autoradiography)을 시행하였다. 자가방사선기록은 labeled isotope의 specific activity에 따라 수 시간에서 수일에 걸쳐 시행하였으며 film processing후 결과적으로 필름상에 기록된 밴드의 음영(density)을 수치로 표준화하기 위하여Densitometer(Phamacia, LKB Biotechnology S-75182 Uppsala, Sweden)를 이용해 분석하였다.

## III. 연구결과

사진 2,3은 Northern분석결과로 나타난 각 실험군의 시간경과에 따른 Type I collagen, TIMP-1, TIMP-2 및 GAPDH mRNA의 자가방사선기록사진이다. GAPDH는 β-actin등과 같이 세포의 생존에 필수적인 house keeping gene으로 세포내 항상 일정량으로 존재하기 때문에 northern분석에서 전기영동시 loading하는 RNA양이 일정한지 혹은 loading양이 약간의 차이가 있더라도 GAPDH의 양으로 표준화할 수 있다. 예를 들어 보고자하는 gene의 변화가 증가를 보이지만 동시에 GAPDH가 같이 증가되면 이 gene의 변화를 증가한다고 설명할 순 없다. 즉 이러한 house keeping gene이 일정하게 나타나면서 보고자하는 gene의 변화가 있을 때 이를 증가 또는 감소와 같은 평가를 할 수 있다는 것이다. 본 연구에서도 사진 2,3에서 나온 각 실험군의 mRNA 밴드를 densitometer로 그 양을 측정하고 이를 각각의 GAPDH값으로 나누어 표준화하였다. 또한 시간경과에 따른 실험군의 변화를 비교하기 위하여 control 값을 1로하고 다른 실험군의 수치를 배(fold)수로 처리하여 증감을 비교하였다.

도표 1,2는 각각 1% 및 10%의 serum에서 type I collagen mRNA변화를 보여준다. 1% serum군에서 100ng/ml 니코틴 농도에서는 특별한 변화가 없음을 보여주지만 1000ng/ml농도에서는 적지만 12시간 이후로 조금씩 증가되는 양상을 보였다. 10% serum군에서 1000ng/ml 농도 에서는 특별한 변화를 보이진 않았지만 100ng/ml에서는 24시간이후 1.5배 에서 2배에 가까운 증가를 보였다.

도표 3,4는 TIMP-1의 변화를 보여주고 있는데 1% 와 10% serum군에서 100ng/ml 및 1000ng/ml농도에서 모두 초기(4시간)에 증가했다가 차차 감소하여 24시간 이후에는 control보다 낮게 나타나는 유사한 경향을 보였는데 특히 10% serum 군의 1000ng/ml농도에서는 control에 비해 초기에 2배 가까이 증가하다가 96시간후에는 반이상 감소하는 큰 변화를 보였다. TIMP-2 mRNA의 변화를 도표 5,6에서 보여주듯이 1% serum군에서 큰 변화를 보이지 않고 단지 100ng/ml농도에서 24시간 경과후 약 1.7배 급증가함을 보였으며 10% serum 군에서도 24시간후에 농도별로 불규칙하게 급증가함을 보였다.

## IV. 고안

흡연자의 평균 혈중 또는 혈청내 니코틴 농도는 실험방법이나 대상에 따라 약간의 차이는 나지만 대개 10-100ng/ml 미만으로 보고되어지고 있으며 흡연과 직접 접촉되는 치은이나 협점막과같은 부위에서는 더 높은 수치를 보여주고 있다.[23,24,25] 또한 흡연자에서 치근활택술을 시행여부에 따라 치근면에서 검출된 니코틴을 보고한 연구[26]를 볼 때 니코틴이 호흡기에서 혈관에 이르는 전신적인 경로를 통해서든 또는 치은열구분비액(gingival crevicular fluid)과 같은 국소적인 경로를 통해서든 치근면에서 검출되는 것으로 보아 치주인대세포에 직접 또는 간접적인 영향을 주게 된다. 치주인대세포는 물리적 또는 화학적인 외부자극에 반응하여 다양한 종류의 단백질이나 효소 또는 효소억제물질 등을 생성 배출할 수 있는 기능을 가지고 있으며(그림 1), 이렇게 생성된 물질이 치주조직의 파괴(destruction), 보수(repair) 및 재생(regeneration)에 관여하게 된다.[14]

*In vitro* 실험에서 배양액에 첨가되어 사용되는 혈청(serum)용액은 주로 그 양의 확보가 용이한 소, 염소 또는 말 등에서 얻게되는데 이러한 각가지 영양소와 성장인자, 기타 단백질이 포함된 용액을 실험실에서 제작하게 되면 동물에서 추출하는 것보다 경제적이지 못하기 때문에 아직 대부분의 *in vitro* 실험에서 이러한 동물로부터 추출된 혈청을 처리하여 사용하고 있다고 본다. 실험의 목적에 따라 혈청용액의 첨가여부를 결정하게 되는데 낮은 농도의 혈청이 포함된 배양액을 통한 실험에선 세포외적 다른 단백질의 방해 또는 관련을 배제시키기에는 적당하나 영양분 부족등으로 인한 세포의 기아현상이 경우에 따라서 바람직하지 못한 결과를 초래할 수 있기 때문에[27,28] 1% serum 실험군에서는 24시간 이상 지속하지 않았다.

1982년 Chamson등[29]은 사람의 피부로부터 추출 배양한 섬

유아세포를 이용하여 흡연성분이 교원 질생성에 미치는 영향을 본 결과 Type I collagen은 증가하고 Type III collagen은 감소하는 연구결과를 보고하며 이러한 결과가 폐조직의 섬유화(fibrosis)현상과 유사하게 나타난다고 주장하였다. 이렇게 흡연성분이 체내 여러조직의 교원질 대사에 미치는 영향은 비정상적인 병적환경을 초래하게 된다.

결과 도표 1,2 에서 Type I collagen mRNA 변화를 보면 10% serum 니코틴 농도 100ng/ml군에서 24시간이후 증가된 양상을 보였는데 1000ng/ml군에서는 큰 변화를 보이지 않는 것으로 보아 니코틴 100ng/ml농도에서 Type I collagen 생성이 촉진되는 경향을 보인다고 말할 수 있겠다.

정상적인 치주인대세포에서 치주조직의 항상성유지를 위해 비교적 높은 농도의 TIMP가 유지됨이 보고된바 있으며 이러한 TIMP농도의 감소는 collagenase 등과같은 MPs의 증가와는 무관하게 상대적인 균형파괴로 치주조직의 파괴를 가져올 수 있다고 추측해 볼 수 있다면 결과도표 3,4에서 전형적으로 보듯이 니코틴 자극초기에 정상군 보다 급증가된 TIMP-1 mRNA가 시간이 경과되면서 점차적으로 감소하여 24시간 이후에는 정상군보다 적은양이 나타남을 알 수 있었다.

이런 결과는 초기 니코틴 자극에 의한 일종의 방어 기전으로 일시적으로 TIMP-1 mRNA의 증가를 보이다가 시간이 경과되면서 지속적인 니코틴 자극이 세포내 TIMP-1의 생성을 감소시킨 것으로 생각되며 이런 결과가 니코틴에 의한 치주조직파괴의 기전중 하나임을 추측하게 한다.

결과도표 5,6 에서 보는 TIMP-2 mRNA의 변화는 결과자체가 불규칙하므로 어떤 의미를 부여하기에는 부족한 점이 많은 것으로 사료된다.

성장인자(growth factor)가 치주인대세포의 교원질대사에 미치는 영향을 본 최근연구에서는 PDGF-AA, 와 BB, TGF-$\beta$ 및 IL-1$\beta$ 중에서 골흡수 요인중 하나인 IL-1$\beta$ 가 MMP-1(collagenase) mRNA의 현저한 증가를 유도하였으며 TGF-$\beta$는 오히려 collagenase mRNA 의 생성을 억제하는 결과를 보였으며 어떤 요소도 TIMP-1 mRNA의 변화에는 영향을 주지 않은 것으로 보고하였다.[30] 이러한 결과로 미루어 볼 때 MPs와 TIMP에 의한 결합조직 파괴는 서로 다른기전으로 작용하는 것이 아닌가하는 추측을 하게된다.

치주질환에서 니코틴이 교원질대사에 미치는 영향을 알아보기 위해서 계획했던 실험내용으로 교원질(Type I collagen)의 생성변화와 이를 파괴하는 MPs 및 MPs와 대응하여 결합조직의 항상성유지에 관여하는 TIMP의 변화를 확인하고자 하였다. 이 중 MPs의 변화를 확인하기위해 CS-3(collagenase)와 ST-1(stromelysin) cDNA를 labeling하여 교배잡종을 한 결과 자가방사선기록에 위 두 probe만 전혀 감지(detection)되지 않은 결과로 나타났다. (결과사진은 개제하지 않았음) 이런 결과를 두가지로 추측해 보건대 첫 번째로는 짧은 실험기간 동안 collagenase의 생성이 할발하지 않았을 수 도 있다는 점인데 원래 정상적인 세포에서도 소량의 collagenase요소가 존재하는 것을 생각해보면 전혀 감지되지 않은 결과를 다른 이유 즉 사용한 세포는 사람의 치주인대세포이고 probe는 rat에서 추출한 cDNA이라서 종별차이에 의한 염기서열순의 불일치 부위가 많아서 교배잡종시 감지를 못했던 것으로 추측할 수 밖엔 없었다.

이점은 차후에 사람에서 추출한 collagenase와 rat collagenase의 DNA sequence를 비교 검토해보아야하는 과제로 남아있다. 니코틴이 교원질대사의 변화에 미치는 영향을 연구하는 데 MPs의 변화는 중요한 의미를 갖는 만큼 이 부분에 대해서는 앞으로도 부가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구를 위하여 아낌없는 지도와 배려를 해주신 버팔로 뉴욕 주립대 치과대학 구강 생물학 조문일 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Bergstrom J and Eliasson S : Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. J Periodont Res 22:513-517,1987.

2. Bergstrom J and Eliasson S : Cigerette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. J Clin Periodontol 14:466-469,1987.

3. Bergstrom J, Eliasson S, and Preber H : Cigarette smoking and periodontal bone loss. J Periodontol 62:242-246,1991.

4. Preber H and Bergstrom J : The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. 13:319-323,1985.

5. Preber H and Bergstrom J : Effect of cigarette smoking on

periodontal healing following surgical therapy. J Clin Periodontol 17:324-328, 1990.

6. Bergstrom J and Preber H : Tobacco use as a risk factor. J Periodontol 65:545-550, 1994.

7. Ten Cate AR, and C. Mills : The development of the periodontium: The origin of alveolar bone. Anat. Rec 173:69-79, 1972.

8. Genco RJ : Host responses in periodontal diseases:Current concepts. J Periodontol 63:338-355, 1992.

9. Overall CM, and J. Sodek : Concanavalin A produces a matrix degradative phenotype in human fibroblasts. J Biol. Chem 265:21141-21151, 1990.

10. Stricklin GP and Welgus HG : Human skin fibroblast collagenase inhibitor: Purification and biochemical characterization. J of Biol. Chem. 258(20):12252-12258, 1983.

11. Herron GS et. al. : Secretion of Metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. J of Biol. Chem. 261(6):2814-2818, 1986.

12. Cambell EJ et. al. : Monocyte procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases. J of Biol. Chem. 262(33):15862-15868, 1987.

13. Kryshtalskyj E, Sodek J, and Ferrier JM : Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitor in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic chamges in experimental periodontitis in the beagle dog. Arch. Oral Biol 31:21-31, 1986.

14. Lekic P and McCulloch CAG : Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. the Anat. Rec 245:327-341, 1996.

15. Green DD et. al. : Immunolocalization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP) in mechanically defotmed fibrous joints. Am J Orhod Dentofac Orthop 97:281-288, 1990.

16. Chiang TM, et. al. : Binding of chemotactic collagen-derived peptides to fibroblasts. The relationship to fibroblast chemotaxis.J Clin Invest 62:916, 1978.

17. Postlethwaite AE, Seyer JM, and Kang AH : Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagens and collagen-derived peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.75:871, 1978.

18. Godpodarowicz D : Extracellular matrix and control of proliferation of vascular endothelial cells. J Clin Invest 65:1351, 1980.

19. Yoshizato K, Taira T, and Shioya N : Collagen-dependent growth suppression and changes in the shape of human dermal fibroblasts. Ann. Plast. Surg. 13:9, 1984.

20. Murphy G and Reynolds JJ : Current views of collagen degradation: Review ArticlesBioEssays 2(2):55-60, 1985.

21. Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, and Liotta LA : Tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP-2): A new member of the metalloproteinase inhibitor family. J of Biological Chemistry 264(29):17374-17378, 1989.

22. Stetler-Stevenson WG et. al. : Tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. J of Biological Chemistry 265(23):13933-13938, 1990.

23. Haines CF, et. al. : Radioimmunoassay of plasma nicotine in habituated and native smokers. Clin Pharm. and Therap. 16(6):1083-1089, 1974.

24. Russell MAH, Jarvis M, Iyer R, and Feyerabend C : Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. Brit. Med. J :971-975, April, 1980.

25. Isaac PF and Rand MJ : Cigarette smoking and plasma levels of nicotine. Nature 236:308-310, 1972.

26. Cuff MJA et. al. : The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. J periodontol 60:564-569, 1989.

27. Freshney RI : Animal cell culture: A practical approach. IRL Press Oxford Washinton DC, 1986.

28. Freshney RI : Culture of animal cells.: A manual of basic technique. 3rd edition Wiley-Liss, 1994.

29. Chamson A, Frey J, and Hivert M. : Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell cultures. J of Toxicol. and Environ. Health 9:921-932, 1982.

30. Alvares O, Grant KG, and Cochran DL : Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. J Periodontol 66:552-558, 1995.

## VI. 영문초록

# The Effects of Nicotine in Human Periodontal Ligament(PDL) Cells on the Expression of Type I collagen, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA In Vitro.

Joon Row, Youn-Sic Chun, Myung-Rae Kim

Dept. of Dentistry, College of Medicine, Ewha Womans University

To investigate the effect of nicotine in human periodontal ligament(PDL) cells, the expression of Type I collagen, Tissue inhibitors of metalloproteinase(TIMP)-1 and TIMP-2 mRNA of nicotine treated human PDL cells were analyzed by Northern analysis to time course and different concentrations of serum and nicotine in culture medium.

The expression of Type I collagen mRNA shows no significant changes except 24, 48, and 96 hours at 100ng/ml nicotine concentrations in 10% serum experimental groups. They show 1.5-1.8 times up-regulated than control. TIMP-1 mRNA shows significantly changes at both serum and nicotine concentration groups. Initially(4 hours) they were peakly up-regulated, then steadily down-regulated to time course and at the end of experiment the expression were shown almost half amount than control in 10% serum experimental groups. TIMP-2 shows no significant changes in all experimental groups. These results, especially in TIMP-1 mRNA changes, suggest the nicotine may destroy the periodontal connective tissues by down-regulates the TIMP-1 mRNA synthesis in periodontal ligament cells.

Key words : Nicotine, Northern analysis, PDL cells, Type I collagen, TIMP-1, TIMP-2.