

中文摘要

由流行病學研究報告指出吸煙會促進牙周病的進行及延遲牙周治療的癒合反應，但從文獻回顧中發現鮮少有研究探討香煙對牙周組織的破壞機轉，所以本研究以組織培養法，培養人類牙周韌帶造纖維母細胞，測定尼古丁對細胞生長、細胞蛋白質合成、GSH 之含量、加入一些自由基捕捉劑或抗氧化劑，以預防醫學的角度，試圖找到一些解毒的藥物，達到化學預防(chemoprevention)的目的；另外以逆反轉聚合媒鏈反應探討尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞所產生 cellular stress，是否會經由 *c-fos* 之 pathway，從分子生物學的角色找到 early gene 調控的機轉，探討香煙的主要成份尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞的抑制機轉。牙周韌帶造纖維母細胞係來自於矯正拔牙的牙齒。實驗結果顯示：尼古丁會對人類牙周韌帶造纖維母細胞產生細胞毒性作用，此一現象會隨著濃度、作用的時間增加而增加 ($p < 0.05$)；且尼古丁也會明顯地抑制細胞增殖及降低蛋白質的合成，尼古丁的濃度在 50 μM 及 200 μM 時分別會抑制 48 % 及 86 % 人類牙周韌帶造纖維母細胞的生長，在 10 mM 濃度的尼古丁會明顯地抑制蛋白質合成量約為控制組的 44 % ($p < 0.05$)；加入細胞外 2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid (OTZ) 可以保護細胞免於尼古丁誘

發的細胞毒性，但在加入 50 μ M BSO (buthionine sulfoximine) 後其可加強尼古丁造成的細胞毒性；superoxide dismutase 及 catalase 並不會影響由尼古丁引起的細胞毒性反應；尼古丁在 5 mM 時會明顯地消耗細胞內 glutathione (GSH) ($p < 0.05$)，同時 glutathione disulfide 也一起跟著減少，由這結果顯示是硫醇(thiol)的消耗，而非因氧自由基引起尼古丁的細胞毒性機制。此外本實驗亦首次發現尼古丁會誘發人類牙周韌帶造纖維母細胞 *c-fos* 早期反應基因的表達，但事先加入 OTZ 處理後會降低 *c-fos* 基因的表達，並且細胞經由 BSO 事先處理後會加強 *c-fos* 基因的表達，這些結果顯示尼古丁在人類牙周韌帶造纖維母細胞中是經由活化 *c-fos* 早期反應基因路徑，並且細胞內硫醇濃度的高低可調節由尼古丁誘導 *c-fos* 基因的表達。

關鍵詞：牙周病、尼古丁、人類牙周韌帶造纖維母細胞、抑制機轉、
硫醇、*c-fos* 基因

英文摘要

The use of tobacco products significantly contributes to the progression of periodontal disease and poor response to healing following periodontal therapy. The purpose of this study was to determine the pathobiological effects of nicotine, a major component of cigarette smoking, on human periodontal ligament fibroblasts (PDLFs) to elucidate its role in periodontal destruction associated with its use. Human PDLFs were derived from healthy individuals undergoing extraction for orthodontic reasons. At a concentration higher than 2.5mM, nicotine was found to exhibit cytotoxic to human PDLFs ($p<0.05$). Nicotine also significantly inhibited cell proliferation and decreased protein synthesis in a dose-dependent manner. At concentrations of 50 and 200 μ M, nicotine suppressed the growth of PDLFs with 48% and 86% ($p<0.05$), respectively. A 10 mM concentration level of nicotine significantly inhibited the protein synthesis to only 44 % of these in the untreated control ($p<0.05$). Furthermore, the effects of anti-oxidants were added to search for the possible mechanism of action, as well as a method for the prevention, of

cigarette smoking-associated periodontal diseases. The addition of OTZ, a precursor of cysteine that metabolically promotes GSH synthesis, acted as a protective effect on the nicotine-induced cytotoxicity. However, superoxide dismutase and catalase did not decrease the nicotine-induced cytotoxicity. In contrast, the addition of BSO, a cellular GSH synthesis inhibitor, enhanced the nicotine-induced cytotoxicity. In addition, nicotine significantly depleted intracellular GSH in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). At a concentration of 5 mM and 20 mM, nicotine depleted about 22.2 % and 56 % of GSH, respectively. The exposure of quiescent human PDLFs to nicotine resulted in the induction of *c-fos* mRNA expression. The peak of *c-fos* mRNA levels induced by nicotine was 5 mM at 2 h incubation period. Kinetic investigations of *c-fos* mRNA expression in nicotine-treated cells revealed a rapid accumulation of the transcript, a significant signal first detectable after 30 min of exposure. This increase was transient and the level of *c-fos* mRNAs returned rapidly to that of control cells by 8 h. OTZ pretreatment decreased in *c-fos* mRNA level and BSO pretreatment enhanced in *c-fos* mRNA level after exposure to nicotine. The levels of nicotine tested inhibited cell growth, proliferation, and protein synthesis

on human PDLFs. This suggests that nicotine itself might augment the destruction of periodontium associated with cigarette smoking. In addition, these inhibitory effects were associated with intracellular thiol levels. Factors that induce glutathione synthesis of human PDLFs may be used for further chemoprevention of cigarette smoking-related periodontal diseases. In addition, *c-fos* gene expression might be one signal transduction pathway linked to the induction of early response genes by cigarette smoking. These results suggest that the nicotine-dependent stress-specific expression of the *c-fos* gene correlates with cellular thiol levels in human PDLFs.

Keywords: periodontal disease; nicotine; human periodontal ligament fibroblasts; inhibitory mechanisms; thiols; *c-fos* gene

前言

牙周病是國人最常見之口腔疾病,也是引發成人牙齒脫落之主要原因。許多研究報告指出牙周病與抽煙後產物有強烈的正相關性(Bergstrom 1989; Ismail *et al.* 1990; Haber *et al.* 1993; Genco 1996),吸煙量與牙周附連喪失程度呈正相關,吸煙者有較多的齒槽骨喪失,且重度吸煙會導致牙齒喪失;且吸煙者對牙周治療的成效較非吸煙者不佳(Preber & Bergstrom 1990; Ah MKB *et al.* 1994);另外吸煙也會影響牙周再生手術的成效(Jones & Triplett 1992)。近年文獻回顧就認為吸煙對牙周病的影響是直接且具有累積性的,美國牙周病學會更將吸煙視為牙周病的一項危險因子(AAP 1996)。

在眾多的香煙產物中,目前被研究的最廣泛,而且被認為最可能會影響牙周組織的物質,正是尼古丁(AAP 1996)。尼古丁是煙草中最主要的生物鹼,約佔煙草中所含生物鹼的百分之九十至百分之九十五。在口腔方面,學者曾指出抽煙者唾液中尼古丁的濃度可高達 1.56 mg/ml,其值是血液中的 100,000 倍(Hoffmann & Adams 1981);另外在體外實驗中曾證實在有牙周病的牙根表面可探測到尼古丁的存在(Cuff *et al.* 1989)。

吸煙對牙周組織的影響,可由免疫反應、微生物學及細胞生物學

等方向來探討。從文獻回顧中發現鮮少有研究探討尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞的抑制機轉，本研究以組織培養法，培養人類牙周韌帶造纖維母細胞，探討尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞的抑制機轉，並且分由下列三個方向來探討：(一) 尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞所產生的毒理機轉，測定尼古丁對細胞生長、細胞蛋白質合成及 GSH 之含量等以分析尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞可能的抑制機轉。(二) 由於先前研究指出香煙代謝的產物可能會產生自由基攻擊細胞，本實驗擬加入一些自由基捕捉劑或抗氧化劑，以預防醫學的角度，試圖找到一些解毒的藥物，達到化學預防(chemoprevention)的目的。(三) 探討尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞所產生 cellular stress，是否會經由 *c-fos* 之 pathway，從分子生物學的角色找到 early gene 調控的機轉。

實驗方法

(一) 牙周韌帶造齦纖維母細胞之培養

本實驗所用之細胞為牙周韌帶造齦纖維母細胞，係來自於矯正拔牙病人之牙齒，並依張等人的方法製備(Chang *et al.* 1999a; Chang *et al.* 2001d)，以 15 號刀片刮取小白齒牙根中間之牙周韌帶，將牙周韌帶組織切成碎片後，置入含有 10 % 胎牛血清(fetal bovine serum)及 1 % PSN 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液中，置入 37 °C 自動恆溫培養箱中培養，約在 7-10 天後可見到造牙周韌帶造齦纖維母細胞從組織塊中長出來，待細胞長滿後再做繼代培養，將細胞接種於培養瓶，置於恆溫箱中培養，捨棄舊培養液，這時細胞成單層 (monolayer) 附著在培養液上。以 PBS 液(一) (phosphate buffer saline 中不含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+}) 洗滌後，加入 0.25 % trypsin 作用之，使細胞剝離懸浮形成單一細胞懸浮液 (single cell suspension)，再加入新的培養液，中止 trypsin 之作用，並利用血球計數盤計數，稀釋至所需之細胞數目為止，再置入新的培養瓶中，並加入新的培養液，再放入 37 °C 自動恆溫培養箱中繼續培養。而實驗所用之細胞代數介於第 3 代到第 8 代間。

(二) 測試藥物之製備

將尼古丁溶入不含血清之培養液中，製備成 0-20 mM 之測試劑量，並將 pH 值調整至 7.4。

(三) 細胞存活率測定

細胞存活率以 MTT 方法(Mosmann 1983)來測定，活細胞會將 MTT 代謝產生藍紫色結晶，此藍紫色結晶可溶於 DMSO 中，藉由測定吸光度即可判斷細胞存活率之程度。將細胞種入 96 孔培養皿內，然後在各孔中植入 2×10^4 個細胞，培養 24 小時之後，將培養液抽掉再換成含 2 % 胎牛血清之培養液，並加入各種不同濃度之尼古丁作用 2、6、24 小時，在試驗終止前加入 MTT 作用，吸除培養液後，加入 DMSO 溶解藍紫色結晶，置於 ELISA reader 測量吸光值，作為細胞存活率判斷的依據。

(四) 細胞增殖試驗

利用[methyl-³H]thymidine 標誌於細胞中 DNA，以作為測定尼古丁影響細胞增殖的標的。並依張等人(Chang *et al.* 1999a; Chang *et al.* 1999b)的方法製備，於 6 孔培養皿內，在各孔中植入 2×10^4 個細胞，培養 24 小時之後，將培養液抽掉再換成含 2 % 血清的培養液與不同濃度之尼古丁作用 4 天，在實驗終了前 24 小時加入放射線同位素濃

度為 $0.5 \mu\text{Ci/ml/well}$ 的 $[\text{methyl-}^3\text{H}]\text{thymidine}$ 測定 DNA 合成量，以 4 之生理食鹽水洗滌，並以 4 5 % 之 trichloroacetic acid (TCA) 固定細胞，如此反覆三次，每次 30 分鐘，再以蒸餾水洗滌兩次，然後加 1 ml 0.1N NaOH 在室溫下作用 15 分鐘後，放入玻璃瓶中加入 3 ml 之閃爍液(aqueous scintillation counting fluid)，利用液體閃爍計數器(liquid scintillation counter)測定細胞內所含之放射能。

(五) 蛋白質合成試驗

依張等人(Chang *et al.* 2001c; Chang *et al.* 2001d)的方法製備，將細胞種入 24 孔培養皿內，然後在各孔中植入 5×10^4 個細胞，培養 24 小時之後，將培養液抽掉再換成含 2 % 胎牛血清之培養液，並加入各種不同濃度之尼古丁作用 18 小時，加入 $^3\text{H-leucine}$ 測定蛋白質之合成，而放射線同位素濃度為 $0.5 \mu\text{Ci/ml/well}$ ，以 4 之生理食鹽水洗滌，並以 4 5 % 之 TCA 固定細胞，如此反覆三次，每次 30 分鐘，再以蒸餾水洗滌兩次，然後溶於 0.5 ml $2 \text{ M NH}_4\text{OH}$ ，放入玻璃瓶中加入 3 ml 之閃爍液，利用液體閃爍計數器測定細胞內所含之放射能。

(六) 藥物對尼古丁細胞毒性的影響

以 MTT 方法(Mosmann 1983)來測定，加入 SOD、catalase、BSO、

OTZ 等化學製劑，探討抗氧化劑或自由基捕捉劑是否能有效抑制尼古丁所產生的細胞毒性作用。

(七) 高效能液相層析儀分析 GSH/GSSG

依 Reed 等人(1980)的方法製備，其原理如下：細胞先利用 5 % perchloric acid (PCA)將蛋白質沉澱，如此酸溶解性的還原態及氧化態 GSH 即溶於 PCA 溶液中，此時將 PCA 溶液取出即可進行製備分析。由於還原態 GSH 在 PCA 中較不易自行氧化成氧化態，所以 PCA 被選來做酸液；PCA 酸液中另外含有 phenanthroline，則可作為鐵螯合劑，可以減少 GSH 在樣品製備過程中氧化為 GSSG。

酸液取出後，加入 iodoacetic acid (IAA)，IAA 在與還原態巯胱甘結合後，使還原態 GSH 多攜帶一負電荷，將可使還原態 GSH 在高效能液相層析儀中比氧化態 GSH(GSSG)先分離出來。在進行 HPLC 分析前利用 KHCO_3 將製備好的酸液先予以中和，成微鹼性。2,2-dinitrofluorobenzene (FDNB)與硫元素反應後生成黃色產物，可利用 UV 檢測器偵測 ($\lambda = 365\text{nm}$)。

樣本製備：將細胞種入直徑 6 cm 培養皿內，各植入 1×10^6 個細胞，培養 24 小時之後，將培養液抽掉再換成含 2 % 胎牛血清之培養液，並加入各種不同濃度之尼古丁作用 6 小時，將培養皿中培養液吸

除後，以 PBS (4) 沖洗二次。加入 1ml 5 % PCA 後，靜置 30 分鐘。取 400 μ l 酸液加入 40 μ l iodoacetic acid (IAA) (120 mg/ml) ，再緩慢加入 potassium bicarbonate (KHCO_3)中和酸液，直到不起泡為止，然後將樣品置於暗處，靜置 15 分鐘。暗反應後，加入 440 μ l 3 % 2,4-dinitrofluoro benzene (FDNB) (溶於 ethanol 中)，震盪混合；經 8 小時冷藏後，以 6,000 \times g 離心 5 分鐘，取上層液並以 0.45 mm 過濾膜過濾後，即可以高效能液相層析儀分析(HPLC)進行分析。GSH 與 oxidized glutathione (GSSG) 的濃度以 nmol/mg protein 來表示之，
 Total GSH= GSH + 2x GSSG。

HPLC 之條件設定：

偵測器波長	365 nm
流速	1.2 ml/min
移動相	Solvent A - 80% Methanol Solvent B- 80% Solvent A + 20% Stock solution B (272g CH_3COONa + 621ml CH_3COOH +189ml H_2O)
Stop time	30 min

濃度梯度變換

Gradient time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	80	20

3	80	20
12	5	95
20	5	95
22	80	20
30	80	20

(八) 蛋白質濃度測定

蛋白質的定量是採用 Bradford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入五分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595nm 可見光之吸光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 OD 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

(九) RNA 萃取

將細胞種入 6 cm 培養皿內，各植入 1×10^6 個細胞，培養 24 小時之後，將培養液抽掉再換成含 0.5 % 胎牛血清之培養液作用 48 小時，並加入各種不同濃度之尼古丁作用 2 小時，將培養皿中培養液吸除後，以 PBS (4) 沖洗二次。利用 TRIzol 萃取細胞內 RNA 置入 1.5 ml 離心管，混合均勻後在冰上靜置，再拿起來混合，重複冰上靜置

及混合，再放到冰上靜置 5 分鐘後，離心 (12,000 xg, 2 分鐘)，取離心管的上層 (RNA 及水層) 到新的離心管，並加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，再離心 (12,000 xg, 2 分鐘)，吸取上澄液到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到水層中看不見白色蛋白質沉澱後，把水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol，混合均勻後放到 -20 冰箱靜置，直到要使用時再拿去離心 (12,000 xg, 4, 30 分鐘)，此時 RNA 會形成一白色沉澱，將 isopropanol 倒掉後，以 75 % 乙醇洗滌之後，將 75 % 乙醇倒掉並吸乾，加入適量的 DEPC-H₂O 溶解 RNA，測量其 260 nm 吸光值並計算 RNA 濃度。

(十) 逆反轉聚合鏈反應

取 2 μg 的 RNA，加入適量的 DEPC-H₂O 後到 33 μl，以 70 加溫處理 5 分鐘 再加入 RNase inhibitor (40U/μl) 0.25 μl, 再加入 5 倍 RT buffer 10 μl 及 dNTP (2.5 mM) 4 μl，和 Oligo dT 1 μl (50 pmole/μl) 及 RTase 1 μl (200U/μl)，在 42 反應 1 小時之後，改以 99 作用 5 分鐘後保存在 4。PCR (polymerase chain reaction)：取 5 μl cDNA 加入適量的 DEPC-H₂O 至 26 μl, 加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5 μl, 加入 3.2 μl dNTP (2.5 mM) 及 5 μl 10X PCR buffer 最後再加入 DNA polymerase

1 μ l (2U/ μ l) , 置於溫度循環機 94 1 分鐘之後 , annealing 溫度 1 分鐘 , 72 2 分鐘共 30 個循環 , 最後再以 72 反應 20 分鐘 , 並於 4 保存。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 是一種 housekeeping gene 用來當作 internal control。而各個基因的 PCR primers 序列如下(Chatzistamou *et al.* 2000):

Gene	Sequence	PCR product (bp)
GAPDH	5' -TCCTCTGACTTCAACAGCGACACC-3' 5' -TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGG-3'	207
<i>c-fos</i>	5' -AAGGAGAATCCGAAGGGAAAGGAATAAGATGGCT-3' 5' -AGACGAAGGAAGACGTGTAAGCAGTGCAGCT-3'	612

(十一) DNA 電泳

先配置 DNA gel , 取 10 μ l 的 PCR 產物加上 2 μ l 的 6 倍 loading dye , 加到 DNA gel。於電壓 100V , 進行電泳 45 分鐘之後 , 以 1 μ g/ml Ethidium bromide 染色 , 再以 ddH₂O 退染 , 於 UV 燈下分析並記錄之 , 並以 AlphaImager 2000 軟體作半定量分析

五、統計分析

為求實驗的準確性,每一實驗至少重複三次,以 one way analysis of variance (ANOVA)來作分析,並 Duncan's test 以來測試處理組間顯著差異效果($p < 0.05$)。

實驗結果

細胞存活率測定

實驗結果顯示尼古丁對人類牙周韌帶造纖維母細胞有細胞毒性 (圖 1), 尼古丁濃度在 5 mM 會抑制細胞去氫酶的活性(dehydrogenase activity) (Mosmann 1983), 使得細胞存活率降低, 此一現象會隨著濃度、作用的時間增加而增加, 且具有統計學上的意義($p < 0.05$)。

細胞增殖試驗

圖 2 顯示尼古丁以 [^3H]-thymidine 標定法對於細胞增殖的影響, 在尼古丁濃度 25 μM 時就被發現會抑制牙周韌帶造纖維母細胞的 DNA 合成, 此一現象會隨著濃度的增加而增加, 且具有統計學上的意義($p < 0.05$)。尼古丁的濃度在 50 μM 時會抑制 DNA 的合成至只有控制組的 52 % ; 而升高尼古丁的濃度至 400 μM 時會完全抑制 DNA 合成。

蛋白質合成試驗

尼古丁對人類牙周韌帶造纖維母細胞蛋白質合成的影響顯示在圖 3。尼古丁加入 ^3H -leucine 作為標記時, 在 5 mM 濃度及更高濃度

時會抑制蛋白質合成，且具有統計學上的意義($p < 0.05$)。在 15 mM 濃度的尼古丁會明顯地抑制蛋白質合成為控制組的 23 %。

藥物對尼古丁細胞毒性的影響

加入三種抗氧化劑去研究是否它們可以保護細胞免於尼古丁之細胞毒性影響，結果發現：SOD (10-100 $\mu\text{g/ml}$)、catalase (5-50 $\mu\text{g/ml}$) 和 OTZ (0.5-10 mM) 對人類牙周韌帶造纖維母細胞並不具有細胞毒性 ($p > 0.05$) (表 1-3)；尼古丁與 OTZ 對人類牙周韌帶造纖維母細胞之綜合效應評估顯示在圖 4，由圖中發現加入細胞外 OTZ 可以保護細胞免於尼古丁誘發的細胞毒性，當 OTZ 的濃度達到 5 mM 時，尼古丁的細胞毒性可被幾乎完全阻斷 ($p < 0.05$)。同時也發現 BSO (5-50 μM) 本身對人類牙周韌帶造纖維母細胞並不具有細胞毒性 ($p > 0.05$) (表 1)，但在加入 50 μM BSO 後則可加強尼古丁造成的細胞毒性，2.5 mM 尼古丁會造成 15 % 細胞死亡，加入 50 μM BSO 後會使得細胞死亡增加至 35 % (圖 5)。然而 SOD 或 catalase 並未顯示對尼古丁引起的細胞毒性具有保護機制 (表 1, 2)。

高效能液相層析儀分析 GSH/GSSG

表 4 以 HPLC 方法來分析尼古丁對人類牙周韌帶造纖維母細胞硫

醇值的影響。結果發現：尼古丁在特定的值之下會明顯地消耗細胞內 GSH ($p < 0.05$)，在 5 mM 及 20 mM 的尼古丁分別會消耗 GSH，其值分別約為對照組的 22.2 % 及 56 %。在對照組的人類牙周韌帶造纖維母細胞在培養期間都維持其原本 GSH 的值，在 oxidative stress，GSH 過氧化 氧化還原 GSH 至氧化態 GSSG。然而，在此份研究硫醇的消耗並不會伴隨 GSH 氧化成 GSSG。

***c-fos* 基因的表達與調控機轉**

為了瞭解尼古丁對 *c-fos* 的效應，利用 RT-PCR 分析 m-RNA 的表達。結果發現：細胞曝露於 2.5 mM 至 20 mM 尼古丁 2 小時之下用 RT-PCR 分析會誘導 *c-fos* m-RNA 的表現 (圖 6)。結果係以 AlphaImager 2000 軟體作半定量分析 (圖 7)，在曝露於 2.5 mM 及 10 mM 尼古丁 2 小時小下，*c-fos* m-RNA 增加約 2.5 及 4.8 倍。在尼古丁濃度超過 20 mM 時，也許是細胞毒性增加的緣故，可偵測到的 *c-fos* m-RNA 會降低，在 2 小時的培養時間下，由尼古丁誘導的 *c-fos* m-RNA 之最高值是在 5 mM，依據此結果，接下來的實驗皆是在 5 mM 濃度下所得到的結果。

在尼古丁處理的細胞誘發 *c-fos* mRNA 呈現出緩慢累積，最先可偵測到的訊息是在曝露於 30 分鐘之後 (圖 8)，這種增加是短暫的且

c-fos mRNA 的值在 8 小時後即快速回復至與控制組相同，而 *c-fos* mRNA 表達之最大值是在曝露 1 小時後，以 AlphaImager 2000 軟體作分析 *c-fos* m-RNA 增加約 6.9 倍（圖 9）。

為了決定是否 GSH 的值會調節人類牙周韌帶造纖維母細胞中 *c-fos* 的表現，先用 OTZ 或 BSO 處理，其可分別提高或降低細胞 GSH 的值。如圖 10 顯示，單獨加入 OTZ 或 BSO 與未加尼古丁處理之控制組比較並不會改變 *c-fos* mRNA 的值，然而使用 OTZ 事先處理會降低尼古丁對 *c-fos* mRNA 的誘導，另外用 BSO 事先處理會增加尼古丁對 *c-fos* mRNA 的誘導 *c-fos*（圖 11）。因此，GSH 之增加對尼古丁誘發的 *c-fos* 表現可以產生反作用的效果。

討論

香煙的反應產物及其一些成分，例如尼古丁，也會直接對細胞作用進而促進牙周組織的破壞。正常的牙齦和牙周韌帶造纖維母細胞對維持牙周組織健康是相當重要的。近年來許多研究顯示與促進牙周組織再生的主要細胞是牙周韌帶造纖維母細胞(Boyko *et al.* 1981 ; Egelberg 1987)，所以任何會抑制此細胞功能的因子，也會影響牙周組織的修復及再生，因此本實驗選擇培養人類牙周韌帶造纖維母細胞做為分析的對象。

先前的研究曾指出尼古丁對從人類牙周組織培養的造纖維母細胞而言是一細胞毒性物質(Peacock *et al.* 1993; Hanes *et al.* 1991; Tipton & Dabbous 1995; Alpar *et al.* 1998; James *et al.* 1999; Giannopoulou *et al.* 1999; Checchi *et al.* 1999; Chang *et al.* 2001)。本實驗結果進一步發現尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞之細胞毒性是藉由抑制細胞生長、增殖及蛋白質合成所造成的，由於造纖維母細胞的生長、增殖及間質蛋白的合成對結締組織附連(connective tissue attachment)的再生是必須的(Boyko *et al.* 1981; MacNeil & Somerman 1993)，所以抽煙者也許因此而更易於遭受牙周的破壞並對牙周治療的再生手術反應較不佳，傷口癒合不如非吸煙者。

在本研究，我們發現 BSO 會加強尼古丁對牙周韌帶造纖維母細胞的細胞毒性，這也許因為 BSO 會不可逆地抑制 GSH 的合成，並且尼古丁會造成 GSH 不斷的消耗，另外藉由加入 OZT 可有效地來對抗尼古丁的細胞毒性。這些發現指出硫醇(thiols)的消耗也許是因尼古丁誘導的細胞毒性一個重要的機制，另本研究亦直接證明在尼古丁濃度大於 5 mM 時會消耗細胞內之 GSH 活性，我們的結果也認同了 Dubick 及 Keen (1991)的報告，他們指出尼古丁會導致肝中 GSH 濃度明顯的降低；香煙水萃取物對 Swiss 3T3 細胞的影響是與細胞內 GSH 值有關(Muller 1995)。而且最近本人的研究發現 peroxynitrite 會消耗人體頰黏膜造纖維母細胞胞內 GSH 的含量 (Chang *et al.* 2000)。所以香煙產物的有害效應可能是經由 GSH 的消耗所造成的。

在氧化緊迫下，GSH 降低時並會使氧化態的 GSSG 形成，但在本實驗中發現 GSH 減少的同時 GSSG 也一起跟著減少，這結果表示尼古丁會消耗掉牙周韌帶造纖維母細胞中的硫醇，而且硫醇的消耗並不會伴隨著氧化緊迫的產生，先前本研究也指出由尼古丁誘發的細胞毒性可由提升細胞 GSH 的活性來防禦，而非由加入自由基捕捉劑來達到，這表示是因硫醇的消耗而造成尼古丁引起的細胞毒性，所以在人類牙周韌帶造纖維母細胞中尼古丁的代謝並非透過自由基的代謝系統。Duthie 等人(1989)曾發現抽煙者紅血球在 SOD 與 catalase 間沒

有明顯關係存在；此外先前的研究曾指出在抽煙者與不抽煙者之間自由基並沒有明顯的不同(Leonard *et al.* 1995)，這些研究都說明香煙的產物代謝與自由基捕捉較無關連。

GSH 參與許多生物反應，包括 反應、分子傳輸、蛋白質及核酸的合成、訊息傳遞、基因表現及保護細胞免於氧化傷害(Kosower & Kosower 1978)。由本篇研究顯示，尼古丁造成 GSH 的消耗可能會使得牙周細胞對抗牙菌斑的能力更顯脆弱，因此吸煙會減弱牙周組織修復及再生的能力。

真核細胞對於各種細胞壓力(cellular stress)會藉由 heat shock 及 stress-related 基因表現作出立即反應。本研究報告發現尼古丁會誘發在休眠(quiescent)狀態的人類牙周韌帶造纖維母細胞 *c-fos* mRNA 基因表現，在以 10 % 胎牛血清正常培養的環境之下，尼古丁亦會誘發 *c-fos* mRNA 基因表現，因此 *c-fos* 基因可被選為當細胞面對外界刺激時早期反應的指標，就我們所知，本研究是第一篇報告尼古丁能誘發牙周韌帶造纖維母細胞 *c-fos* 基因表現，*c-fos* mRNA 基因的表達也許是一條訊息傳遞路徑與由抽煙引起的早期基因反應有關。

先前研究報告曾指出，當 Swiss 3T3 細胞曝露於磷酸緩衝食鹽水捕捉的香煙成分(cigarette smoke trapped in phosphate-buffered saline)時，會導致壓力反應基因 *c-fos* 的表現 (Muller 1995)；抽煙的反應產

物 peroxynitrite 也被發現會誘發 Swiss 3T3 細胞及老鼠肺細胞 RF-L6 *c-fos* 基因的表現(Muller 1995; Muller *et al.* 1997) , 這些報告皆認為抽煙引起的有害反應是透過持續活化 *c-fos* 早期反應基因路徑造成的。

迄今由尼古丁誘導的 *c-fos* 基因表現的機轉仍有待釐清, GSH 能藉由直接清除捕捉或間接經由 GSH 過氧化 /GSH 系統調節的細胞內活性氧(reactive oxygen species)含量(Deneken & Fanburg 1989)。GSH 是個主要的細胞抗氧化劑, 且在細胞防禦許多外來化合物(reactive foreign compounds)的攻擊上佔有重要的角色(Meister & Anderson 1983)。學者曾提出藉由各種環境壓力使得硫醇可扮演著調控 *c-fos* 的角色。為了瞭解 GSH 含量是否會調節尼古丁引發人類牙周韌帶造纖維母細胞的 *c-fos* 基因表現, 我們將細胞先以 OTZ 或 BSO 事先處理, 實驗結果顯示, 與未事先處理的對照組比較, 單獨加入 OTZ 或 BSO 並不會改變 *c-fos* mRNA 的表現, 然而以 OTZ 事先處理會降低尼古丁對 *c-fos* 基因的誘導, 同樣的結果也曾被 Janssen 等人(1995)所發現, 雖然 BSO 本身並不會誘發 *c-fos* 反應, 但在青石綿中用 BSO 事先處理過的細胞中會促進 *c-fos* 基因表現, 然而當石綿加入 *N-acetyl-L-cysteine* 會抑制 *c-fos* 基因的表現; Muller (1995)曾報告指出藉由加入 cysteine 及 *N-acetyl-L-cysteine* 可抑制 smoke-bubbled PBS 所誘發的 *c-fos* stress gene 反應也可支持此種解釋。這些結果顯示硫

醇也許扮演著對抗尼古丁誘導的早期反應基因(early response gene)的細胞內緩衝液(buffer)的角色。

綜合實驗結果，尼古丁會明顯地抑制細胞生長、增殖、蛋白質合成與消耗硫醇來影響人類牙周韌帶造纖維母細胞之生長，而細胞硫醇的消耗也許使細胞易於受抽煙中的牙菌斑的其他作用物質，這也可解釋尼古丁對於發炎牙周疾病的病因、進行及治療結果上扮演一重要的危險因子的角色，所以增加飲食中硫醇的攝取也許對抽煙引起的牙周疾病有預防及降低的作用；另在抽煙者牙齦標本中可偵測在高量的metallothionein，此現象為抵禦牙齦中的自由基的結果(Katsuragi et al. 1997)，所以發展可以誘導細胞合成硫醇的物質也許對於由抽煙引起牙周疾病的抵禦上是有效的方法。尼古丁會誘發人類牙周韌帶造纖維母細胞 *c-fos* 早期反應基因，但經由加入 OTZ 會降低尼古丁誘導的 *c-fos*，並且細胞若經由 BSO 事先處理會加強 *c-fos* mRNA，這些結果顯示尼古丁在人類牙周韌帶造纖維母細胞中是經由活化 *c-fos* 早期反應基因路徑。此外，細胞內硫醇值可調節由尼古丁誘導的 *c-fos* 基因表現。因此，尼古丁在體外及體內的訊息轉換的研究是未來研究的目標。

香煙成分物質中含有數千種成分，包括各種致癌物及腫瘤趨化物質(IARC 1986)。除了在此篇對尼古丁的細胞毒性的研究，對於其他

香煙物質對牙周病的病理研究也是相當重要的。

Ah MKB, Johnson GK, Kaldahl WB, Patil KD, Kalkwarf KL. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1994; **21**: 91-97.

Alexander AG. The relationship between tobacco smoking, calculus, and plaque accumulation and gingivitis. *Dent Health* 1970; **9**: 6-9.

Alpar B, Leyhausen G, Sapotnik A, Gunay H, Geurtsen W. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingival fibroblast cultures. *Clin Oral Invest* 1998; **2**: 40-46.

Andrews GK, Harding MA, Calret JP, Adamson ED. The heat shock response in HeLa cells is accompanied by elevated expression of the *c-fos* protooncogene. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 3452-3458.

Bastiaan RJ, Waite IM. Effects of tobacco smoke on plaque development and gingivitis. *J Periodontol* 1978; **49**: 480-482.

Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res* 1994; **54**: 36-40.

Bergstrom J. Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1989; **17**: 245-247.

- Bergstrom J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol* 1994; **65**: 540-550.
- Boyko GA, Melcher AH, Brunetle DM. Formation of a new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture *in vitro*. *J Periodont Res* 1981; **16**: 73-88.
- Brandtzaeg P, Jamison HC. A study of periodontal health and oral hygiene in Norwegian army recruits. *J Periodontol* 1964; **35**: 302-307.
- Bravo R. Genes induced during the G₀/G₁ transition in mouse fibroblasts. *Cancer Biol* 1990; **1**: 37-46.
- Cate ART. Oral Histology: development, structure, and function: 4 th ed, Cate ed, Mosby Co., St. Louis, 1994; pp. 81-99.
- Cerutti P. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991; **21**: 1-5.
- Chang YC, Tai KW, Chou LSS, Chou MY. Effects of Camphorated parachlorophenol on human periodontal ligament cells *in vitro*. *J Endodon* 1999a; **25**: 779-781.
- Chang YC, Tai KW, Lii CK, Chou LSS, Chou MY. Cytopathologic effects of arecoline on human gingival fibroblasts *in vitro*. *Clin Oral Invest* 1999b; **3**: 25-29.

- Chang YC, Tai KW, Chou MY, Tseng TH. Synergistic effects of peroxy nitrite on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts. *Toxicol Lett* 2000; **118**: 61-68.
- Chang YC, Lii CK, Tai KW, Chou MY. Adverse effects of arecoline and nicotine on human periodontal ligament fibroblasts *in vitro*. *J Clin Periodontol* 2001a; **28**: 277-282.
- Chang YC, Hu CC, Tseng TH, Tai KW, Lii CK, Chou MY. Synergistic effects of nicotine on arecoline-induced cytotoxicity in human buccal mucosal fibroblasts. *J Oral Pathol Med* 2001b; **30**: 458-464.
- Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001c; **91**: 230-234.
- Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001d; **92**: 446-450.
- Chatzistamou I, Svhalley AV, Sun B, Armatis P, Szepeshazi K. Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial cancers and *c-jun* and *c-fos* oncogene expression by bombesin antagonists. *Brith J Cancer* 2000; **83**: 906-913.
- Checchi L, Ciapetti G, Monaco G, Ori G. The effect of nicotine and age

on replication and viability of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Clin Periodontol* 1999; **26**: 636-642.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription from AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; **54**: 541-552.

Crawford D, Ibinden I, Amstad P, Cerutti P. Oxidant stress induces the protooncogenes *c-fos* and *c-myc* in mouse epidermal cells. *Oncogene* 1988; **3**: 27-32.

Cotgreave IA, Moldeus P, Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1988; **28**: 189-212.

Cuff MJ, McQuade MJ, Scheidt MJ, Sutherland DE, Van Dyke TE. The presence of nicotine on root surfaces of periodontally diseased teeth in smokers. *J Periodontol* 1989; **60**: 564-569.

Deneken SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; **257**, 163-172.

Dethmers JK, Meister A. Glutathione export by human lymphoid cells: Depletion of glutathione by inhibition of its synthesis decrease export and increases sensitivity to irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;

78: 7492-7496.

Demaster BO, Shirota FN, Redfem B, Goon DJW, Nagasawa HT.

Analysis of hepatic reduced glutathione, cysteine and homocysteine by cation ion-exchange high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatog* 1984; 308: 83-91.

Dubick MA, Kree CL. Influence of nicotine on trace element

concentrations and tissue antioxidant defense. *Biol Trace Element Res* 1991; **31**: 97-109.

Duthie GG, Arthur JR, James WPI, et al. Antioxidant status of smokers

and nonsmoker: effect of vitamin E supplementation. *Ann NY Acad Sci* 1989; **570**: 435-428.

Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodont*

Res 1987; **22**: 233-242.

Eichel B, Shahriek. HA. Tobacco smoke toxicity, loss of human oral

leukocyte function and fluid cell metabolism. *Science* 1969; **166**: 1424-1428.

Feldmen RS, Bravacos JS, Rose CL. Association between smoking

different tobacco products and periodontal disease indexes. *J Periodontol* 1983; **54**: 481-488.

Frei B, Stocker R, Ames B. Small molecule antioxidant defenses in human extracellular fluids. In: Scandalios JG ed. *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1992, pp. 23-45.

Freshney RI. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Chapter 1 & 6. Wiley-Liss Inc. New York, 1994.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996; **67**: 1041-1049.

Giannopoulou C, Geinoz A, Cimasoni G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts *in vitro*. *J Clin Periodontol* 1999; **26**: 49-55.

Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 1986; **234**: 80-83.

Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol* 1993; **64**: 16-23.

Halliwell B. Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. In: *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. Advances

- in pharmacology. Vol.38. San Diego: Academic Press, 1997; pp. 3-20.
- Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding uptake and releases of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1991; **62**: 147-152.
- Hoffmann D, Adams JD. Carcinogenic tobacco-specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Res* 1981; **41**: 4305-4308.
- Hoffman D, Wynder EL. Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. In: Tobacco, A Major International Health. London: Oxford University Press; 1986: pp. 145-165.
- Ismail AI, Morrison FC, Burt BA, Caffesse RG, Kavanagh MT. Natural history of periodontal diseases in adults: Findings from the Tecumesh Periodontal Disease study, 1959-89. *J Dent Res* 1990; **69**: 430-435.
- International Agency for Research on Cancer. Chemistry and analysis of tobacco smoke. In: IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Tobacco smoking, IARC Lyon France 1986; **8**: 86-89.
- James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 1999; **70**: 518-525.

Janssen YMW, Heintz NH, Mossman BT. Induction of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogene expression by asbestos is ameliorated by *N*-acetyl-*L*-cysteine in mesothelial cells. *Cancer Res* 1995; 55: 2085-2089.

Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: A review of evidence and implication for patient care. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50: 237-239.

Karin M, Smeal T. Control of transcription factors by signal transduction pathway: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 418-422.

Katsuragi H, Hasegawa A, Saito K. Distribution of metallothionein in cigarette smokers and non-smokers in advanced periodontitis patients. *J Periodontol* 1997; **68**: 1005-1009.

Kenney EB, Kraal JH, Saxe SR, Jones J. The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leucocytes. *J Periodont Res* 1977; **12**: 227-234.

Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 1978; 54: 109-159.

Kristoffersen T. Periodontal conditions in Norwegian soldiers: An

epidemiological and experimental study. *Scand J Dent Res* 1970; **78**: 34-53.

Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, Vermu I. Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein. *Nature* 1984; 312: 711-716.

Lane JD, Opara EC, Rose JE, Bohm F. Quitting smoking raises whole blood glutathione. *Physiol Behavior* 1996; **60**: 1379-1381.

Leonard MB, Lawton K, Watson ID, MacFarlane I. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 385-387.

Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Plaque induced periodontitis in beagle dogs. *J Periodont Res* 1975; **10**: 243-255.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1963; **36**: 177-187.

MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodont Res* 1993; **28**: 550-559.

Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; **220**: 472-477.

Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17205-17208.

Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994; **54**: 1969-1975.

Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Methods* 1983; **65**: 55-63.

Mulder and Ouwerkerk-Mahadevan. Modulation of glutathione conjugation *in vivo*: how to decrease glutathione conjugation *in vivo* or in intact cellular system *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions* 1997; **105**: 17-34.

Muller T. Expression of *c-fos* in quiescent Swiss 3T3 cells exposed to aqueous cigarette smoke fractions. *Cancer Res* 1995; **55**: 1972-1982.

Muller T, Haussmann HJ, Schepers G. Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-reducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 295-301.

Muller T, Gegel S. The cellular stress response induced by aqueous extracts of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 797-801.

Pabst MJ, Pabst KM, Collier JA, Coleman TC, Lemons-Prince ML, Godat MS, Waring MB, Babu JP. Inhibition of neutrophil and

monocyte defensive functions by nicotine. *J Periodontol* 1995; **66**: 1047-1055.

Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O' Neal RB, Strong SL, Van Dyke TE. The effect of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Periodontol* 1993; **64**: 658-665.

Peng TK, Yao JH, Shih KS, Dong YJ, Chen CK, Pai L. Assessment of periodontal disease in an adult population survey in Taipei City using CPITN and GPM/T indices. *Chin Dent J* 1990; **9**: 67-74.

Preber H, Bergstrom J. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy. *J Clin Periodontol* 1990; **17**: 324-328.

Rauscher FJ, Cohen DR, Curran T, Bos TJ, Vogt PK, Bohmann D, Tijan R, Franza BR Jr. Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* protooncogene. *Science* 1988; **240**: 1010-1016.

Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 1980; **106**: 55-62.

Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *J Periodontol* 1986; **57**: 617-624.

- Shaw JP, Chew IN. Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblast. *J Cell Physiol* 1986; **129**: 193-198.
- Sheiham A. Periodontal disease and oral cleanliness in tobacco smokers. *J Periodontol* 1971; **42**:259-263.
- Shibanuma M, Kuroki T, Nose K. Induction of DNA replication and expression of protooncogene *c-myc* and *c-fos* in quiescent BALB/3T3 cells by xanthine/xanthine oxidase. *Oncogene* 1988; **3**: 17-21.
- The American Academy of Periodontology. Tobacco use and the periodontal patients. *J Periodontol* 1996; **67**: 51-56.
- Tipton DA, Dabbous Mkh. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Periodontol* 1995; **56**: 1056-1064.
- Williamsan JM, Boettcher B, Meister A. Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 6246-6249.