

생물학적 활성물질에서 치아우식 예방제 개발에 관한 연구
I. 인조치아 disc PAHA의 제조 및 식물추출물들의 치아우식 예방효과

*이 기 용 · 조 효 상 · 윤 정 원 · *허 태 련
수원대학교 공과대학 유전공학과
*인하대학교 공과대학 생물공학과

Study on the development of preventive agent of
dental caries from biological active materials
I. Development of disc PAHA for an artificial tooth and preventive
effect on dental caries from plant extracts

*Ki Yong Lee, Hou Sang Cho, Jeong Weon Yoon and *Tae Ryon Hae

Department of Genetic Engineering, College of Engineering,
The University of Suwon, Suwon P. O. Box 77, Korea

*Department of Biological Engineering, College of Engineering,
Inha University, Incheon, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to develop an artificial dentin for easy handle and accurate observation of the mechanism on dental caries and to screen biologically active materials from the extracts of traditional plants and fruits for prevention of early dental cares.

In order to produce disc PAHA (artificial dentin), the powdered hydroxylapatite was immobilized in a 20% polyacrylamide gel. The characteristics of disc PAHA was very similar to the surface, figure and lattice of human enamel after decalcification in 0.1M citric acid based on observation with SEM. The critical point of decalcification of disc PAHA by acids was found to be pH 5.0-5.5, which was in agreement with human enamel. The degree of decalcification from disc PAHA in 0.1M citric acid solution was sixfold higher than that of human enamel. This result suggested that disc PAHA would be useful as a substitute of human enamel for *in vitro* experiment. The extracts of garlic and Flower Apple A, B seemed to inhibit growth of *S. mutans*. Especially, when the 300 μ l of its extracts added to the medium to incubate *S. mutans*, F. apple B showed strongly an inhibitory effect in both the growth of *S. mutans* and the synthesis of insoluble glucan.

서 론

우리나라는 지난 이십여 년 간 국민의 소득 수준이 급격히 향상되면서 전통적 식생활에도 많은 영향을 미쳐(1), 설탕이 많이 가미되고 정제된 간식 등

을 섭취함에 따라, 치아우식증(충치, dental caries)이 점차 증가되는 현상이 나타나고 있으므로, 효과적인 관리대책이 절실히 요구되고 있다.

이와 같이 증가추세에 있는 치아우식증은 치아를 상실하는 중요한 원인 질환의 발생원인으로는 그 발

생기구는 Miller의 화학세균설(2, 3), Gottlieb의 단백질용해설(4-6), Schatz의 단백질용해성 킬레이션설(7, 8) 등이 비교적 신빙성 있는 학설로 인정되고는 있으나, 아직까지 발생기구가 확실히 규명되고 있지 못하고 있다. 따라서 그 예방법 또한 확립되어 있지 못한 실정에 있고, 불소 화합물의 이용법, 식이조절법, 치면세균막 관리법 및 치면열구 전색법 등이 병용되어 이용되고는 있으나, 충분한 효과를 거두지 못하고 있다(9). 한편, 최근의 연구결과들에 의하면 구강내에 상존하는 미생물 중에서도 *Streptococcus mutans*가 충치발생의 중요 원인균임이 밝혀졌다(10, 11). 이 균주가 분비하는 glucosyltransferase (GTase)는 type I 과 type II가 있으며, 설당을 기질로 GTase II는 α -1, 3 결합이 주된 불용성 glucan을 합성한다(12). *S. mutans*는 이 불용성 glucan과 혼합 증식하면서 치면에 세균막으로 부착되고, 이 치면세균막 속에 존재하는 *S. mutans*가 분비하는 각종 유기산들은 치아 법랑질을 탈회시켜 초기 충치의 원인이 된다(13-16). 따라서 현재까지 연구되어 온 치아우식 예방제 개발 현황으로는 GTase inhibitor, glucanase, 또는 법랑질 강화제로서 불소 사용 등에 그치고 있어(17-22) 효과적인 치아우식예방제의 개발에 의한 국민 구강 보건 향상에 이렇다할 효과를 거두지 못하고 있는 실정이므로 일부 식물 및 열매류의 치아우식예방효과를 조사하였고, 실험의 간편화를 위하여 인조치아를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

인조치아의 제조

20ml acrylamide-bisacrylamide(30 : 0.8w/w)에 8.5ml ammonium persulfate(0.15g/10ml), 0.01ml TEMED(N, N, N', N'-teramethylethylenediamine)을 혼합하여 20% polyacrylamide gel를 만들고, 이 gel에 5.0g hydroxylapatite powder(BDH Chemical社, England)를 넣어 잘 섞어준 다음 내경이 0.9cm, 길이 50cm인 유리봉에 넣어 굳힌다.

Gel이 완전히 굳은 후 유리봉으로부터 gel를 분리하여 두께가 0.3cm가 되도록 절단하고, 성형절단된 동전모양의 polyacrylamide hydroxylapatite(disc PAHA)는 증류수에 담가 4℃에서 보관한다(Fig. 1).

식물추출물 제조방법

식물 및 열매류들 25g에 증류수 50ml를 조적분쇄기에 넣고 마쇄하여 네 겹의 거즈로 거른 다음, 20

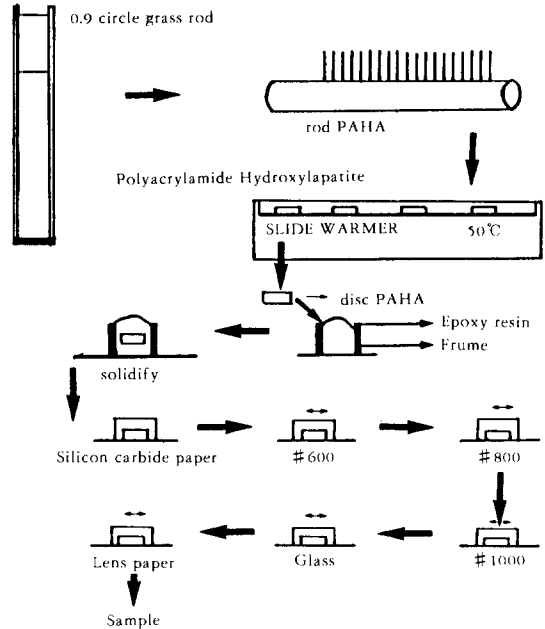


Fig. 1. The preparation of disc PAHA and treatment for scanning electron microscopic examination.

분간 100,000rpm으로 원심분리한 후 상등액을 분리하여 측정에 사용하였다.

AAS에 의한 칼슘정량 및 방사성 인 ^{32}P 에 의한 탈회도 측정

용액 내의 칼슘은 atomic absorption spectrophotometer(GBC Scientific Equip. PTY. LTD, Model 903)로 측정하였으며, 사람의 치아로부터의 탈회도 측정은 탈회되는 칼슘량이 극미량이므로 우선, 치아 절편을 epoxy resin에 매몰시켜 한면만 노출시킨 후, 4%의 중성 포름알데히드 용액이 들어 있는 석영관에 넣어 원자로 속에 넣고 중성자를 조사하여 상아질 구성성분인 인을 ^{32}P 으로 변화시켰다. 중성자 조사한 γ -선량은 0.5mR/h로서 서울대학교 치과대학 예방치학교실에서 받았다. 이 방사성 치아절편에서 사에 의해 탈회되어 나온 방사성 인은 liquid scintillation counter(LKB-Wallac, 1209)로서 방사능의 양을 측정하였다.

S. mutans 배양 및 증식에 따른 disc PAHA의 칼슘 탈회도 측정

*S. mutans*는 서울대학교 치과대학 예방치학교실로

부터 분주받은 Sero type C, ATCC 10449를 사용하였으며, 10ml THB(Todd-Hewitt Broth), BHI(Brain Heart Infusion), THB+2% sucrose가 들어 있는 15ml cap tube에 미리 8시간 동안 THB에서 배양된 대수기의 *S. mutans* 100 μ l (10⁹cells/ml)를 접종하여, 37 $^{\circ}$ C로 혐기조(candle jar)에서 세워서 배양하거나, 지면에서 30 $^{\circ}$ 기울여 배양하였다.

S. mutans 증식에 따른 disc PAHA의 칼슘탈회도는 위와 같은 배양방법에 disc PAHA를 첨가하여 배양한 후, 이 배양액 1ml를 취하여 disc PAHA로부터 탈회된 Ca⁺⁺의 양을 측정하였다. *S. mutans*의 농도는 haematocytometer 또는 660nm에서 spectrophotometer으로 흡광도를 측정하였다.

치아우식 예방효과의 1차 탐색

10ml THB(2% sucrose 함유)에 미리 8시간 동안 THB에서 배양된 *S. mutans* 배양액 100 μ l를 접종한 후, 탐색물질 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 500 μ l, 또는 1,000 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 혐기조에서 10시간 배양한 다음에 pH변화와 660nm에서 탐색물질에 의한 *S. mutans*의 증식억제도를 측정하였다.

치아우식 예방효과의 2차 탐색

치아우식 예방효과가 있다고 1차 판정된 물질을 가지고 GTase에 의한 불용성 glucan의 합성억제와 인조치아 및 치아절편에서의 탈회도를 측정하여 2차적으로 치아우식 예방효과를 검토하였다.

10ml THB(2% sucrose 함유)에 1개의 disc PAHA 또는 치아절편을 넣고 멸균한 후, 무균의 30 μ l ¹⁴C-sucrose(540mCi/mmol, 100,000cpm/ μ l)와 탐색 물질을 넣고 100 μ l *S. mutans*를 접종하여 12시간 동안 배양한 후, 1ml를 취하여 원심분리(10,000 \times g/15min)하여 상등액 0.5ml는 탈회된 칼슘량을 정량하였고, pellet은 아래 그림과 같이 수세한 후, LSC를 사용하여 sucrose로부터 합성된 insoluble glucan의 양을 측정하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

인조치아의 개발 및 사람 치아와의 유사성

충치예방제를 효과적이며 단시간 내에 탐색하기 위하여 개발한 인조치아(disc PAHA)는 증류수에 3개월간 보관한 결과 유리된 칼슘이 0.025ppm으로 매우 낮았고, 121 $^{\circ}$ C로 15분간 증기압살균기에서 멸균했을 때에도 형태가 보존되는 등 매우 안정하였다.

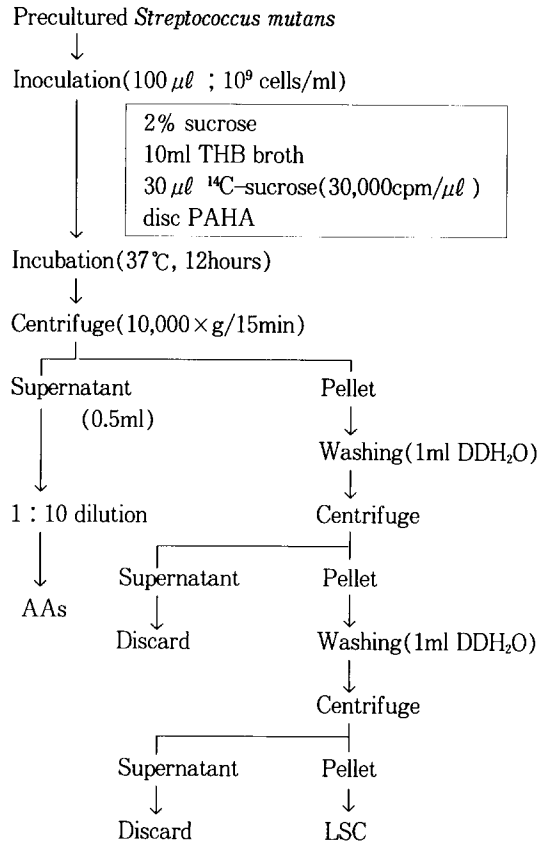
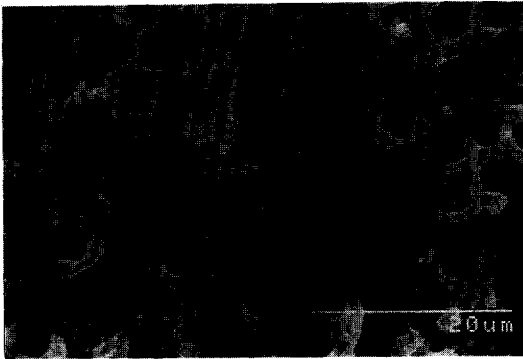


Fig. 2. The second screening method of the preventive effective materials from biological active substance on dental caries.

사람 치아는 수산화인회석 결정을 단백질 격자가 둘러싸고 있으므로, 산에 의해 탈회될 경우 이 격자만 남게 된다. 따라서, 0.1M citric acid로 치아와 인조치아를 3시간 및 30분 동안 각각 처리한 후, 전자현미경 사진으로 관찰해 본 결과 그림 3과 같이 격자 모양만 남은 것으로 보아, disc PAHA도 치아와 매우 유사한 구조로 polyacrylamide 격자가 수산화인회석을 둘러싸고 있음을 보여 주었다.

한편, 인조치아를 가지고 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 용액에 여러 가지 산으로 제조한 단계별 pH 용액에서의 탈회도를 측정한 결과, lactic acid, acetic acid, propionic acid 그리고 ascorbic acid의 경우에 임계탈회 pH 5.0 부근에서 급격히 탈회가 일어남을 확인할 수 있었다. 그러나 citric acid의 경우는 이미 pH가 6.0일 때 다른 산의 pH 5.5일



(A)



(B)

Fig. 3. Scanning electron microscopic photographs of human enamel and disc PAHA.
A: 0.1M citric acid treated human enamel.
B: 0.01M citric acid treated disc PAHA.

때 보다 적게는 2배 정도에서부터 많게는 8배 정도의 매우 높은 탈회력을 나타냈고, 이에 반해 무기산인 phosphoric acid와 hydrochloric acid(HCl)의 경우는 pH가 4.0에 이를 때까지 그다지 높지 않은 탈회력을 그대로 유지함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

방사성 상아질 절편에서 여러 가지 산에 의한 탈회도를 측정된 결과 citric acid에서 lactic acid나 acetic acid보다 탈회도가 현저히 높으며 임계탈회 pH도 5.0에서 5.5로서 Feagen 등(23)과 Harris 등(24)의 주장과 잘 일치하였으므로, 인조치아인 disc PAHA는 사람치아와 탈회도에서 매우 유사하여(Fig. 5) 충치예방제 탐색에 이용할 경우, 짧은 시간 내에 실험을 마칠 수 있으며, 임상실험에 근접한 충치예방제의 효과를 검토할 수 있다고 사료되었다.

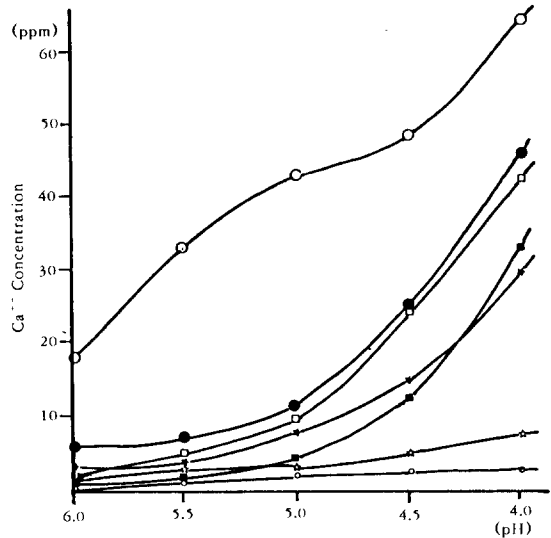


Fig. 4. Calcium demineralization effect of acids at various pH value on disc PAHA.

○ : citric acid, ● : lactic acid,
□ : acetic acid, ■ : ascorbic acid,
★ : propionic acid, ☆ : phosphoric acid,
◇ : hydrochloric acid.

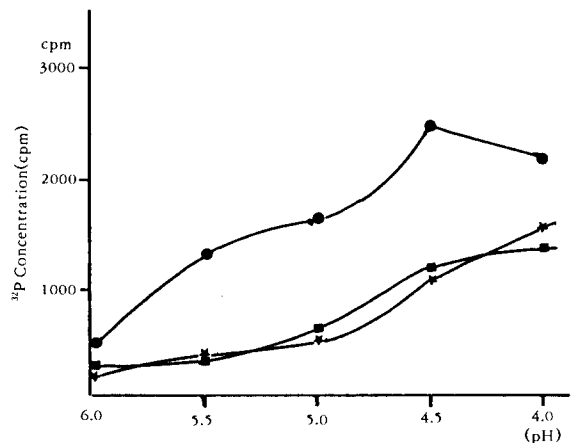


Fig. 5. ³²P demineralization according to the different kind of acids and various pH from radioactive human tooth.

● : citric acid, ★ : lactic acid, ■ : acetic acid.

식물 및 열매류 추출물로부터 치아우식 예방효과 탐색

전통적으로 구강 환경위생에 이용되어 오던 식물

Table 1. The inhibitory effect of plant extracts on growth of *Streptococcus mutans*.

Tested material	Growth	pH after 18hours
Control	+++	4.24
도 토 리	+++	4.31
탱 자	+++	4.26
쇠 뜨 기	+++	4.32
복 승 아	+++	4.25
모 과	+++	4.41
꽃 사 과 B	---	4.09
달 맛 이 꽃	+++	4.19
대 추	+++	4.36
쌀 겨	+++	4.61
마 늘	+--	7.15
검 은 콩	+++	4.45
파	+++	4.68
꽃 사 과 A	---	5.25
아 기 똥	+++	4.76
파 배	+++	4.71

및 열매류 중에서 동의보감 및 약용식물 등을 참조하여, 이들을 증류수에서 마쇄한 후에 거르로 거른 다음 100,000×g로 20분간 원심분리 시킨 후, 상등액을 가지고 대표적인 충치원인균인 *S. mutans*의 증식 억제효과를 1차 검토한 결과 표 1과 같이 나타났다.

꽃사과 종류가 *S. mutans*의 증식을 거의 억제하였으며, 관상용 꽃사과 A보다는 꽃사과 B의 억제효과가 크게 나타나 계속해서 2차 탐색을 실시하였다. 마늘 추출물은 일반적으로 항균효과가 알려져 있으나 4℃로 저장했을 경우에 1주일 후에는 억제효과가 거의 없어서 안정성이 없는 것으로 나타났다.

꽃사과 B추출물을 각 농도별로 *S. mutans*의 배양액에 첨가한 다음에 pH변화와 *S. mutans*의 증식도를 600nm에서 측정하였다(Fig. 6).

꽃사과 B추출물을 100 μl 첨가했을 때 이미 48%의 증식억제가 나타났으며 300 μl에서부터 94% 이상의 억제효과를 보였다. 500 μl 이상에서 배지의 pH값이 낮아진 것은 꽃사과 B추출물 자체가 citric acid 등의 유기산을 많이 포함하고 있기 때문인 것으로 사료되었다.

꽃사과 B추출물로 치아우식 예방효과의 2차 탐색을 실시한 결과 100 μl를 첨가했을 때 이미 disc PAHA 및 치아절편에서 glucan 합성억제작용이 나타났다으며 300 μl를 첨가했을 때는 *S. mutans*에 의한 glucan 합성이 거의 중단된 것으로 나타나, 치아

Table 2. The inhibitory effect of F. apple B extract on glucan synthesis of ¹⁴C-sucrose and Ca⁺⁺ demineralization of disc PAHA.

Extract of f. apple B	disc PAHA		human enamel	
	demineral. (Ca ⁺⁺ , ppm)	synthesis of glucan(cpm)	demineral. (Ca ⁺⁺ , ppm)	synthesis of glucan(cpm)
Control	14.8	268.2	18.1	184.9
100 μl	8.0	204.2	16.2	149.6
200 μl	10.6	48.1	17.9	63.7
300 μl	12.8	1.7	22.7	8.5
400 μl	20.6	-8.9	31.8	2.0
500 μl	44.5	-8.4	44.9	0.3

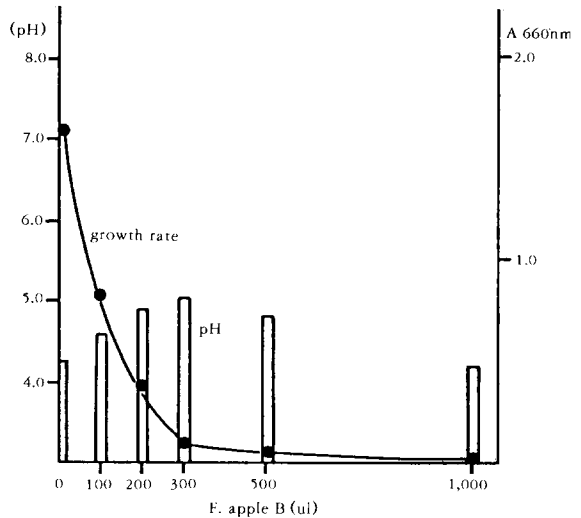


Fig. 6. The inhibitory effect of extracts from F. apple B on growth rate *S. mutans* after 18hours.

우식 예방효과가 매우 크다는 것을 알 수 있었다 (Table 2). 한편, disc PAHA 및 치아절편에서의 탈회도는 꽃사과 B물질이 억제효과가 나타나지 않았는데 이것은 꽃사과 B물질 자체의 유기산에 12시간 동안 접촉하여 일어난 것이지 *S. mutans*에 의한 작용은 아닌 것으로 사료되었다.

꽃사과 B추출물의 부분정제

꽃사과 B추출물 성분중에서 치아우식 예방효과가

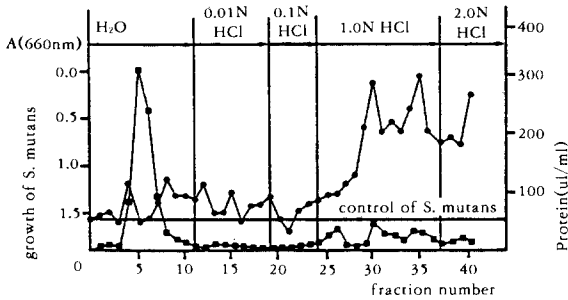


Fig. 7. Inhibitory effect of each reactions from extract of F. apple B by Amberlite IRA 400 on growth rate of *S. mutans*.

Table 3. The amount of organic acids in each fractions of Amberlite IRA 400 from extrat of F. apple B by HPLC.

No	Oxalic acid	Lactate	Citrate	Propionate	Total
23	0.1*	0.1	T	T	0.2
24	3.6	0.9	1.8	T	6.3
26	0.3	0.3	3.3	12.4	16.3
27	1.6	0.5	4.6	14.6	21.3
28	5.5	0.5	6.2	1.6	13.8
29	3.1	11.8	7.1	T	22.0
30	1.6	T	7.6	T	9.2
31	1.3	0.6	8.4	0.4	10.7
32	1.2	0.5	8.2	14.9	24.8
33	1.8	T	8.5	0.5	10.8
34	4	0.4	8.1	0.4	10.3
35	1.3	0.2	7.7	10.9	20.1
36	1.5	0.4	7.6	0.5	10.0
37	3.1	10.0	6.9	T	20.0
38	1.5	0.4	7.0	0.5	9.4
39	1.9	T	7.2	0.5	9.6
40	1.4	0.2	5.6	2.1	9.3

(T: trace, *; $\mu\text{M}/5 \text{ ul}$ extract of F. apple B)

있는 물질을 정제하기 위하여 우선 Amberlite IRA 400(Aldrich Chemical Co.)을 가지고 $150 \times 20\text{cm}$ 의 column을 이용하여 HCl용액으로 step gradient system으로 유출시키며 3ml씩 분획을 얻은 결과, 그림 7과 같이 23분획부터 *S. mutans* 증식억제효과가 나타나기 시작했으며 특히 30번, 35번 및 40번 분획에서 가장 높은 증식억제효과가 나타났다(Fig. 7).

한편, 이 분획들을 Lowry 방법으로서(25) 단백

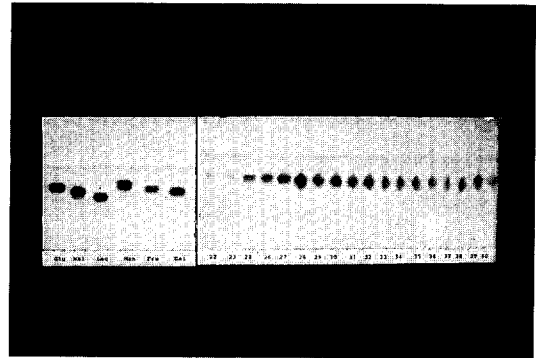


Fig. 8. TLC chromatogram of standard sugars and fraction No. 22-40 from extracts of F. apple B.

Solvent(Isopropanol:water, 4: 1)

Location reagent(Aniline-dipheylamine)

질 정량을 실시한 결과, 단백질은 No. 4-No. 7 분획에서 대부분이 나타난 것으로 보아 치아우식 예방효과가 있는 물질은 아미노산으로 이루어져 있지 않다고 여겨졌다.

다음으로 꽃사과 B물질에 유기산이 많으므로 HPLC(Waters, M484, Bondapak C_{18} , 5% Acetonitrile)로 각 분획을 분석해 본 결과 표 3과 같이 일반적인 산들이 대부분으로 특정한 산이 나타나지 않았으므로 꽃사과 B의 활성물질은 유기산의 일종이 아닌 것으로 나타났다.

마지막으로, 꽃사과 B추출물 중에서 *S. mutans* 증식억제물질을 가지고 표준당과 함께 TLC plate에서 *S. mutans* 증식억제가 있었던 24번 분획부터 40번 분획까지를 전개시켰다(Fig. 8). 억제효과가 나타나지 않았던 분획 22와 분획 23의 경우 당이 검출되지 않았으나 억제효과가 나타났던 분획 24에서부터 분획 40까지 모두 당이 공통적으로 검출되었다.

그러므로 지금까지의 결과로 미루어 볼 때 꽃사과 B추출물의 *S. mutans* 증식억제효과 및 glucan 합성억제효과 물질은 glyco-amine 유도체일 가능성이 컸다.

요 약

치아우식 예방제 개발을 실험실 내에서 간편하고 정확하게 수행하기 위하여 인조치아를 개발하고 전래되어 오는 구강환경위생에 이용되어 오던 식물 및 열매류 중에서 치아우식 예방효과가 있는 생리활성

물질을 탐색하고자 하였다. 20% polyacrylamide gel에 hydroxylapatite를 혼합하여 인조치아(disc PAHA)를 제조하였으며 이 인조치아는 전자현미경 관찰 결과, 표면의 형태나 지지체의 격자모양 및 산에 의해 부식되었을 때의 모양이 사람의 치아와 매우 유사하였다.

disc PAHA와 human enamel을 가지고 산에 의한 탈회도를 비교한 결과 임계탈회 수소이온 농도가 pH 5.0-5.5로서 일치하였으며 탈회속도는 disc PAHA가 치아보다 6배 정도 빠르게 나타나 실험실에서 대용치아로 사용하기에 적합한 것으로 사료되었다.

식물 및 열매류 추출물 중 1차적으로 꽃사과 A와 B 그리고 마늘이 *S. mutans*의 증식억제효과가 있음을 발견하였고, 이 중에서도 특히 꽃사과 B는 300 μ l를 첨가했을 때 *S. mutans*에 의한 불용성 glucan의 합성을 거의 억제하는 효과를 나타내었다. 이 꽃사과 B물질을 가지고 기초적인 분리를 실시한 결과 치아우식 예방효과가 있는 물질은 glycose-amine 유도체인 것으로 사료되었다.

감 사

본 연구는 1990년도 문교부 학술연구 조성비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 金鐘培, 崔有鎮, 金鐘悅(1983), 口腔 保健學, p. 31, 改訂 增補版, 高文社.
2. W. D. Miller(1889), *Die microorganismen des Mundhohle*, Leipzig.
3. W. D. Miller(1905), New theories concerning decay of teeth, **47**, p. 1293, D. Cosmos.
4. B. Gottlieb(1944a), *J. D. Res.*, **23**, 141.
5. B. Gottlieb(1944b), *J. D. Res.*, **23**, 379.
6. B. Gottlieb(1948), *J. Amer. Dent. Assoc.* **31**, 1482.
7. A. Schatz and J. J. Martin(1955), *Proc. Penn. Acad. Soc.* **26**, 48.
8. A. Schatz, K. E. Karsan, J. J. Martin and V. Schatz(1957), *Odont. Revy.*, **8**, 154.
9. 윤정원, 백대일, 김종배(1990), 대한구강학회지, **14**, 54.
10. R. J. Fitzgerald and P. H. Keyes(1960), *J. Am. Dent. Assoc.*, **61**, 9.
11. J. Carlsson(1968), *Odontol. Revy.*, **19**, 137.
12. M. D. Hare, S. Svensson and G. J. Walker (1978), *Carbohy. Res.*, **66**, 245.
13. S. Hamada(1978), *Microbios Letters*, **5**, 141.
14. S. Hamada and H. D. Slade(1980), *Bacterial Adherence*, ed. by E. H. Beachey, p. 736 Chapman and Hall, London.
15. A. William and B. S. Nolte(1982), *Oral microbiology with basic microbiology and immunology*, p. 736 The C. V. Mosby Company.
16. 윤정원, 백대일, 문혁수, 김종배(1991), 대한구강학회지, **15**(2), 207.
17. 浜田茂幸, 古賀敏比古(1981), 化學と生物, **19**, 695.
18. 浜田茂幸, 日本齒科評論(1974), **378**, 32.
19. M. Takashio and Y. Okami(1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**(10), 1171.
20. N. Kakiuchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**(2), 720.
21. 최선진, 이시영, 송요한(1989), *Kor. Jour. Microbiol.*, **27**(1), 48.
22. E. Shigeyuki, K. Kato, S. Kotani and A. Misaki(1975), *J. Bacteriol.*, **124**(3), 1489.
23. F. F. Feagen and J. A. Gray(1977), *Caries Res.*, **11**(1), 79.
24. N. O. Haris and B. K. Norling(1982), The everchanging tooth surface in demineralization and remineralization, *Primary Preventive Dentistry*, Appleton and Large 3rd ed, p. 246.
25. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randal(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.