

# Lipomyces starkeyi KSM 22 Glucanhydrolase 용액의 치은 섬유아세포에 대한 영향

윤현정 · 정현주 · 김옥수 · 김도만\*

전남대학교 치과대학 치주과학교실, 치의학 연구소, 공과대학 생물화공과\*

## I. 서론

치주질환의 주원인인 치태 내 고형 성분은 약 70 ~ 80%의 세균과 약 20 ~ 30%의 간질로 되어있으며 이 간질에는 다당류인 dextran, levan, mutan 등이 주로 함유되어 세균의 영양원이나 치태 내 세균의 유지와 고정에 기여하고 있다. 그러므로 치태의 형성 억제 및 제거는 치주 질환의 예방 및 치유에 있어 매우 중요하다. 일상 생활에서의 치태 제거를 위하여 칫솔질 등의 기계적인 방법이 가장 보편적이면서 중요한데 이것만으로는 완전한 치태 제거가 어려워 보조적으로 구강 세정제를 이용하는 방법이 필요할 수 있다.

대표적인 구강 세정제인 chlorhexidine digluconate는 bisguanide 계통으로서 현재 사용되는 제재 중 가장 효과적인 치태 억제제이지만<sup>6)</sup> 구강 내 착색, 미각 이상, 연조직 치유 지연 등의 부작용이 보고되고 있으며<sup>1-6)</sup> 치은 섬유아세포나 치주인대 세포에 세포 독성을 보이고 있어<sup>7-9)</sup> 새로운 구강 세정제 개발이 요구되고 있다. Dextranase는 화학적 치태 억제 방법중의 하나로 효소를 이용하여 치태 성숙을 억제하기 위한 방법으로 치태 간질 성분 중 하나인 dextran을 분해하여 치태 억제 효과를 가진다<sup>3)</sup>. 즉 치태 내 세균이 주로 생성하는 세포의 다당류는 주로  $\alpha(1-3)$  linked glucan인 불용성 mutan과  $\alpha(1-6)$

linked glucan인 수용성 dextran으로 구성되어 있는데 이 중 dextran을 분해한다. Dextranase의 효능에 대해서는 과거 여러 연구를 통하여 동물 실험에서 치태 총 중량의 감소와 치태 지수 감소 등의 좋은 효과가 보고되었으나<sup>1,14)</sup> 또 다른 연구에서는 그 효과가 유의하지 않는 등<sup>12)</sup>의 상반된 결과를 보였다.

1995년 Kim 등<sup>20)</sup>은 *Lipomyces starkeyi* KSM 22에서 얻은 새로운 glucanhydrolase가 *Streptococcus*나 *Penicillium*에서 추출된 dextranase와는 달리 dextranase활성 외에 mutanase, amylase의 효능을 가짐을 관찰하였고 이 새로운 glucanhydrolase를 치태 억제에 위하여 치과 영역에 응용할 수 있다고 제안하였다<sup>20-22)</sup>. Son 등<sup>23)</sup>과 Song 등<sup>24)</sup>은 이 *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase를 함유한 용액으로 구강 세정한 후 효과를 관찰한 연구에서 chlorhexidine 사용 시와 유사하거나 우수한 치태 억제 및 치은염 예방 효과가 있음을 보고하였다.

이에 이번 연구에서는 *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase 함유 용액의 세포에 대한 영향에 관하여 연구하여 새로운 구강 세정제로서 개발되어 사용될 수 있는지 알아보려고 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

### 1) 치은 섬유아세포 배양

두 명의 전신질환이 없는 건강한 성인에서 임상치관 연장술 시 얻은 건강한 치은 조직편을 2% 항생제 (100 U/ml ampicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco, USA))가 함유된 PBS로 5회 세척한 후 결합 조직만을 분리하여 약 1×1×1 mm<sup>3</sup> 크기로 세절한 후 5 ~ 6 개의 결합조직 조각을 35 mm 배양접시(Nunc, Denmark)에 놓고 배지를 첨가하지 않은 상태로 30 분간 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에 두어 조직이 배양접시에 부착되도록 하였다. 조직이 배양접시에 부착되면 1% 항생제와 10% 우태아혈청(FBS ; Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Gibco, USA)을 첨가한 후 계속 배양하였다. 다음날 배지를 교환하며 이후 세포가 밀생에 도달하기까지 3일마다 교환하였다. 조직으로부터 성장한 세포가 밀생에 도달하면 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA (Gibco, USA) 1 ml를 첨가하여 세포가 배양접시로부터 분리되도록 한 후 10% FBS를 함유한 DMEM을 첨가하는 방법으로 계대 배양하여 4 ~ 6 세대의 세포를 이용하였다. 26세 흡연자인 남성에서 얻은 세포를 strain 1, 18세 비흡연 여성에서 얻은 세포를 strain 2로 하였다.

### 2) Glucanhydrolase의 준비

*Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase 동결 건조 분말(주) 라이프엔자의 연구개발팀에서 제공)을 DMEM 용액이나 PBS용액에 용해시켜 세포 부착 및 세포 증식 관찰에 사용하였다. 세포 부착 실험 시는 100배 농축액을 사용하여 10% FBS를 함유한 DMEM 배지 내의 최종 농도가 0.5 unit, 1 unit, 2 unit 이 되도록 하였고, 증식 실험을 위하여 PBS 50 ml에 분말 0.03 g, 0.06 g, 0.12 g을 용해시켜 0.5, 1, 2 unit의 용액을 만든 후 0.45 µm pore size의 millipore filter membrane (Corning, Germany)에 여과시킨 다음 사용하였다. 이 경우 1 unit란 효소 기질로서 2% (w/v) dextran이나 수용성 전분(soluble starch)과 반응 시 1 분에 1 µmol의 isomaltose나 maltose를 유리시킬 수 있는 효소의 양이다.

### 3) Chlorhexidine의 준비

세포 부착실험을 위하여 20% chlorhexidine 용액 (chlorhexidine, Sigma, U. S. A.)을 10% FBS를 함유한 DMEM 배지로 희석하여 최종 농도가 0.1%가 되도록 하였고, 세포 증식실험을 위하여 사용한 용액은 PBS로 희석하여 0.1%가 되도록 하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 세포 부착 및 부착세포 활성화도 관찰

계대 배양한 치은 섬유아세포를 96-microwell plate에 각 well당 1×10<sup>4</sup> 세포가 포함되도록 분주하였다. 실험군 각 well에 1% 항생제와 10% FBS이 함유된 DMEM 배지에 glucanhydrolase 농축 용액을 첨가시켜 최종 배지 내 농도가 0.5, 1, 2 unit이 되게 하였고, 또 다른 well에는 0.1% chlorhexidine 함유 배지를 첨가하고, 정상 배지인 1% 항생제와 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 대조군 well로 하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에 두었다. 분주한 세포가 각각의 용액에 노출된 지 30 분, 1.5, 3, 6, 24 시간 후 세포 부착 및 부착세포의 형태 변화를 도립위 상차현미경(Olympus, Japan) 하에서 관찰하고, 부착 세포 수를 측정하였다.

부착된 세포의 수 산정을 위하여 각 well에 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 처리하여 부착된 세포를 분리하였으며 0.4% trypan blue (Gibco, USA)로 염색한 후 hemocytometer (Marienfeld, Germany)를 이용하여 광학 현미경 하에서 세포 수를 계수하였다.

부착세포 활성화도 측정을 위해서 MTT (Dimethyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA) 검사를 시행하였다. 각 well당 20 µl의 MTT를 배지에 첨가한 후 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 3 ~ 4 시간동안 더 배양한 후 MTT 용액을 제거하였다. 생성된 formazan 결정을 DMSO (Dimethyl sulfoxamide, Sigma, USA) 50 µl를 넣어 녹인 후 다른 microwell plate에 옮겨 담아 ELISA reader (Emax<sup>®</sup> precision microplate reader, Molecular Devices Corp, USA)를 이용하여 630 nm를 기준으로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2) 세포 증식 및 세포 활성도 측정

계대 배양한 치은 섬유아세포를 96-microwell plate에 각 well당  $1 \times 10^4$  세포가 포함되도록 분주하고 24 시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에 두어 정상적인 세포의 부착이 이루어지도록 한 후 실험 용액에 노출시켰다. 실험 용액에의 노출은 기존의 배지를 제거하고 각각의 용액에 노출시킨 후 다시 새로운 배지로 교환하는 방법을 택하였으며 이 때 실제 임상에서의 구강 세정제 사용을 모방하기 위해 12 시간 간격으로 1일 2회, 1회 1분씩 노출시켰다. 실험 용액에 노출시킨 2일, 7일 후 세포 증식양상을 관찰하고 세포 수를 산정하였으며 MTT 검사를 통하여 세포 활성도를 측정하였다.

## 3) 통계 분석

실험은 두개의 strain에 대하여 각각 3배수로 시행하였고, 세포 부착률, 세포 증식률, 세포활성도의 평균치와 표준편차를 산출하였다. 군간 비교 및 glucanhydrolase 농도에 따른 비교 분석을 위하여 student's t test ( $P < 0.05$ )를 시행하였다.

# III. 결과

## 1. 세포 부착 형태의 변화

배양 30 분 후 대조군에서의 치은 섬유아세포는 일부 세포들의 부착상을 관찰할 수 있었으며 원형의 세포 형태를 보였다(Figure 1a). glucanhydrolase나 0.1% chlorhexidine에 노출된 실험군에서도 유사한 소견을 보여주었다(Figure 1b~1e).

배양 1.5 시간 후 대조군과 실험군에서 세포 부착이 계속되면서 원형의 세포가 점점 방추형으로 바뀌어 가는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2a~2d). 그러나 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 여전히 대부분 세포가 원형의 형태를 보여주었고 방추형으로의 세포 변화는 거의 관찰되지 않았다(Figure 2e).

배양 3 시간 후 대조군과 glucanhydrolase 처치군에서 방추형 세포의 수가 이전에 비하여 증가하였고 그 세포 길이도 증가된 소견이 관찰되었다(Figure

3a~3d). 반면 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 방추형 세포는 거의 나타나지 않고 여전히 대부분의 세포가 원형을 보이고 있었다(Figure 3e).

배양 6 시간 후 대조군과 glucanhydrolase 처치군에서는 거의 모든 세포가 방추형으로 부착하였고 세포 밀도도 증가하였으며 부유하는 세포는 거의 관찰되지 않았다(Figure 4a~4d). 반면 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 여전히 원형의 세포가 대부분을 차지하고 있었고 3 시간 배양시 소견에 비하여 부유 세포가 더 많아졌다(Figure 4e).

배양 24 시간 후 대조군과 glucanhydrolase 처치군에서 방추형의 세포 형태를 보여주며(Figure 5a~5d), 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 여전히 원형의 세포 형태를 보여주었고 6 시간 경과 후와 유사한 소견을 보여주었다(Figure 5e). 이러한 양상은 strain 1과 2에서 동일하게 관찰되었다.

## 2. 세포 부착에 대한 영향

대조군에서는 30 분 경과 후 처음 분주한 세포 수의 약 40%가 부착되었으며 3 시간 경과 후 약 78%, 6 시간 이후에는 대부분의 세포가 부착되었다. 0.5와 1 unit의 glucanhydrolase 처치군에서는 30 분 경과 후 같은 시간 대조군의 55~60% 수준의 세포 부착도를 보여주었다. 부착 세포의 활성도는 0.5와 1 unit의 glucanhydrolase 처치군에서 30 분 경과 후 대조군의 89% 수준을 보여주었다. 2 unit glucanhydrolase 처치군에서는 30 분 경과 후 세포 부착률은 최초 분주 세포수의 24%, 같은 시간대 대조군의 60% 수준을 보여주었고 부착 세포의 활성도는 대조군의 96% 수준을 보여주었으며 6 시간 경과 후 거의 모든 세포가 부착되었고, 같은 시간대 대조군의 94%에 달하는 세포 활성도를 보여주었다. 반면 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 30 분 경과 후 분주 세포의 9%, 대조군의 22%에 불과한 세포 부착도를 보여주었고 세포 활성도에 있어서도 대조군의 9% 정도에 이르어 다른 군과 비교 시 유의하게 낮았고 이러한 경향은 전 관찰 시간동안 나타났다(Table 1, 2, Figure 6, 7).

각 세포당 MTT 활성도 관찰 시 대조군과 glucan-

**Table 1. Number of gingival fibroblasts attached on 96-microwell plate**

	Control	Glucanhydrolase			0,1% chlorhexidine
		0,5 u	1 u	2 u	
0,5 hr	4533±1123 (40,5)	3267±846 (29,2)	3267±427 (29,2)	2733±275 (24,4)*	1000±383 (8,9)*
1,5 hr	6867±485 (61,3)	6667±442 (59,5)	6200±1579 (55,4)	5867±1928 (52,4)*	1533±537 (13,7)*
3 hr	8733±537 (78,0)	8800±516 (78,6)	8400±730 (75,0)	8333±814 (74,4)*	1200±327 (10,7)*
6 hr	11467±718 (102,4)	10733±709 (95,8)	11533±1315 (103,0)	11600±2592 (103,6)	1133±537 (10,1)*
24 hr	11200±400 (100)	11733±550 (104,8)	12200±856 (108,9)	10867±629 (97,0)	733±275 (6,5)*

Values are mean±SD of cell numbers (n=6).

Values in parentheses are percentile ratio related to the cell number of the control at 24 hour incubation.

\* : significantly different from the control by student's t test at p < 0,05.

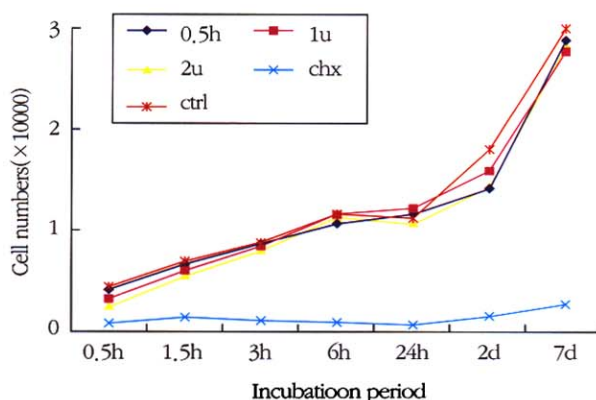
**Table 2. MTT activity of gingival fibroblasts attached on 96-microwell plate**

	Control	Glucanhydrolase			0,1% chlorhexidine
		0,5 u	1 u	2 u	
0,5 hr	0,081±0,005 (100)	0,072±0,003 (88,9)	0,072±0,004 (88,9)	0,078±0,006 (96,3)	0,007±0,005 ( 8,6)*
1,5 hr	0,084±0,005 (100)	0,082±0,008 (97,6)	0,079±0,008 (94,1)	0,076±0,006 (90,5)	0,012±0,010 (14,3)*
3 hr	0,091±0,014 (100)	0,095±0,009 (104,4)	0,078±0,006 (85,7)	0,086±0,005 (94,5)	0,015±0,013 (16,5)*
6 hr	0,098±0,003 (100)	0,106±0,010 (108,2)	0,084 ±0,005 (85,7)	0,092±0,008 (93,9)	0,013±0,010 (13,3)*
24 hr	0,130±0,023 (100)	0,106±0,012 (81,5)*	0,094 ±0,014 (72,3)*	0,096±0,012 (73,8)*	0,010±0,004 (7,7)*

Values are mean±SD of cell numbers (n=6).

Values in parentheses are percentile ratio related to the cell number of the control.

\* : significantly different from the control by student's t test at p<0,05.



**Figure 6. The numbers of attached and proliferated cells**

hydrolase 처치군에서 분주 후 3 시간 경과 시까지 약간 감소하는 경향을 보였으나 24 시간 후 회복됨을 관찰할 수 있었다. 분주 30 분 후 세포당 활성도는 대조군이 glucanhydrolase 처치군보다 낮은 수준을

보여주었으나 24 시간 경과 후에는 대조군이 가장 높은 경향을 보였다. 이러한 경향은 사용한 두 strain의 섬유아세포 모두 glucanhydrolase 처치군과 대조군에서는 동일한 양상으로 나타났다(Figure 8).

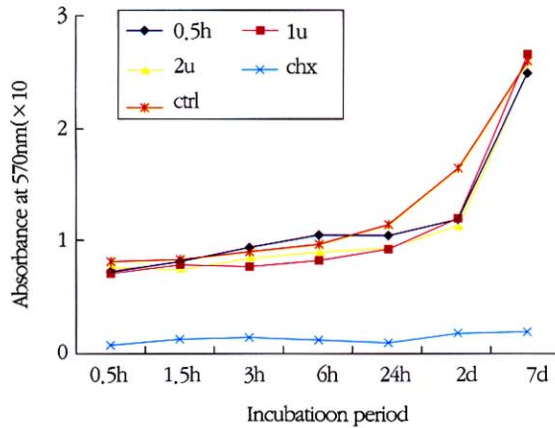


Figure 7. The MTT activity of attached and proliferated cells

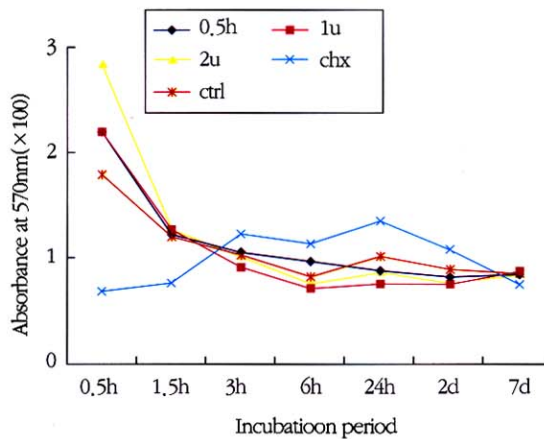


Figure 8. The individual cell activity of attached and proliferated cell

Table 3. Number of gingival fibroblasts proliferated on 96-microwell plate

	Control	Glucanhydrolase			0.1% chlorhexidine
		0.5 u	1 u	2 u	
2 days	18200±1381(60,5)	14267±1561(47,5)*	15867±1147(52,8)*	14600± 792(48,6)*	1733± 277(5,8)*
7 days	30067±1118(100)	28933± 639(96,2)	29467± 596(98,0)	28467± 485(94,7)	2867±1450(9,5)*

Values are mean±SD of cell numbers (n=6).

Values in parentheses are percentile ratio related to the cell number of the control at 7 days incubation.

\* : significantly different from the control by student' s t test at p<0.05

그러나 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 두 strain 이 서로 다른 양상을 보여주었다. 즉 두 strain의 세포 수와 활성도를 관찰해보면 strain 1에서는 1.5 시간

경과 후부터 약간 회복되는 경향을 보이다가 24 시간 후 급격히 감소하는 결과를 보여주었으나 strain 2에서는 24 시간이 경과할 때까지 유의한 변화는 보이지

Table 4. MTT activity of gingival fibroblasts proliferated on 96-microwell plate

	Control	Glucanhydrolase			0,1% chlorhexidine
		0,5 u	1 u	2 u	
2 days	0,166±0,009(100)	0,120±0,008(72,3)*	0,121±0,005(72,9)*	0,115±0,006(69,3)*	0,019±0,002(11,4)*
7 days	0,262±0,001(100)	0,251±0,010(95,8)	0,260±0,020(101,9)	0,253±0,035(96,6)	0,022±0,002(8,4)*

Values are mean±SD of cell numbers (n=6).

Values in parentheses are percentile ratio related to the cell number of the control.

\* : significantly different from the control by student' s t test at p<0,05

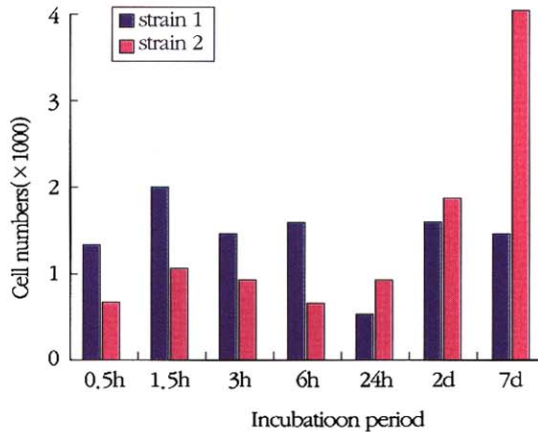


Figure 9. The cell numbers of 0,1% chlorhexidine group

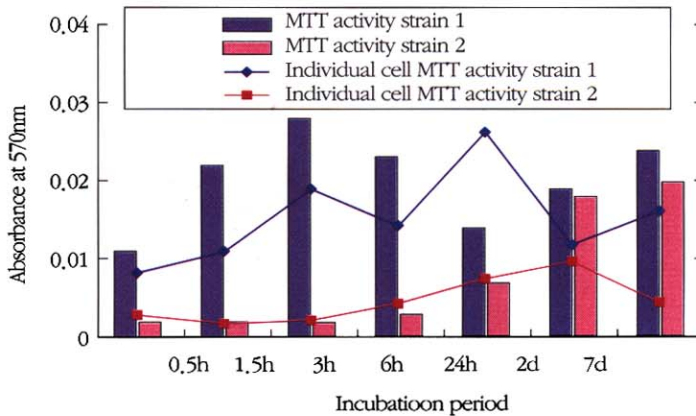


Figure 10. The MTT activity of cells in 0,1% chlorhexidine group

않았다(Figure 9, 10). 따라서 세포당 활성도는 strain 1에서는 분주 3 시간 후까지 증가하다 6 시간 후에는 감소, 24 시간 후에는 다시 증가하여 분주 30 분 후

다 증가된 활성도를 보여주었다. 그러나 strain 2에서는 분주 3 시간까지는 거의 변화가 없다가 24 시간 경과 시까지 서서히 증가하였으며 전체적인 활성도는

strain 1에서 더 높게 나타났다(Figure 10).

### 3. 세포 증식에 대한 영향

세포 증식과 관련하여 glucanhydrolase 처치군은 대조군과 유사한 양상으로 나타나 7일 후에는 밀생에 도달하였으며 0.1% chlorhexidine 처치군에 있어서는 세포가 거의 증식하지 않았다. 2일 후 glucanhydrolase 처치군은 증식 세포 수와 세포 활성도에 있어서 대조군의 70 ~ 87%의 소견을 보여주었으나 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 대조군의 약 10% 정도밖에 미치지 못하였다. 7일 후 glucanhydrolase 처치군은 대조군의 95% 수준 이상의 세포 수와 세포 활성도를 보여주었으나 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 대조군의 10%에도 미치지 못하였다(Table 3, 4, Figure 6, 7).

각 세포당 활성도는 glucanhydrolase 처치군과 대조군에서 관찰기간에 관계없이 일정하였으나 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 strain 따라 세포증식량상과 세포 활성도가 상이하어, 단위 세포당 활성도가 2일과 7일 후 strain 1에서는 증가하였으나 strain 2에서는 감소하였다(Figure 9, 10).

## IV. 총괄 및 고찰

치주질환의 주요 원인인 세균성 치태를 제거하기 위해 기계적 방법이 일반적으로 사용되지만 완전한 제거는 어렵고 또한 기계적 방법의 사용이 어려운 경우가 많아 부가적인 구강 세정제의 사용이 필요하다.

1940년대 영국의 Imperial Chemical Industries에서 개발된 chlorhexidine은 현재까지 가장 효과적이고 안정적인 구강 세정제로 알려져 있다. 이 chlorhexidine에 대하여 1969년 Schroeder가 치태 억제 작용을 처음 보고한 이래 1986년 Segreto 등<sup>4)</sup>이 임상 실험을 통해 0.12%의 chlorhexidine 용액을 1일 2회 20 cc 세정 시 치태 제거 및 치은염 억제 효과가 있음을 보고하였고 1989년 Banting 등<sup>6)</sup>도 0.12%의 chlorhexidine 용액을 2년 동안 1일 2회, 1회에 30초 동안 사용 시 치은연상 치태, 치은염, 치은 출혈 등의

억제 효과가 있음을 보고하는 등 그 효과가 널리 인정되어 왔다. 그러나 chlorhexidine 세정제는 음이온성 청정제와 칼슘 이온에 의하여 비활성화되거나 구강 내 부착 부위에서 방해받을 단점이 있고<sup>2,3)</sup> 장기간 사용 시 치아 및 혀의 변색, 미각이상, 점막자극 과민증 등의 부작용이 있으며<sup>1,2)</sup> 인간의 치은 섬유아 세포의 단백질 합성과 세포 증식을 억제하는 등의 세포 독성이 있으며<sup>7)</sup> 연조직 치유를 지연시킨다고<sup>8,9)</sup> 알려져 있다.

Dextranase 또한 보조적인 구강 세정제 성분으로 한때 연구되었는데, 국소적으로 도포 시 치태의 건조 중량 감소가 있었다는 Loebene 등<sup>11)</sup>의 보고와 달리 Caldwell 등<sup>12)</sup>은 임상 연구 결과 치태 억제 효과가 통계학적으로 유의하게 높지는 않다고 보고하였다. 이는 기존의 *Streptococcus*나 *Penicillium*에서 유래한 dextranase가 수용성 dextran을 쉽게 분해하지만 불용성 mutan을 분해하는 데에는 한계가 있으며, 치태의 성숙도에 따라 dextran이 차지하는 비중이 달라 성숙한 치태에서는 dextranase의 영향이 크지 않을 수 있으며 치태 내 세균의 비중에 따라 그 효과가 달라지기 때문이라고 추정되고 있다<sup>2)</sup>.

한편 Kim 등<sup>20, 21)</sup>과 Ryu 등<sup>22)</sup>은 in vitro 실험에서 *Lipomyces starkeyi* KSM 22에서 얻은 glucanhydrolase가 dextranase 활성 외에 mutanase 및 amylase 활성을 동시에 가지고 있어 보다 높은 치태 형성 억제 및 제거 효과를 나타냈다고 보고하였다. *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase는 *Penicillium* dextranase와 비교하여 불 때 불용성 mutan 분해능이 3.7배 더 높고 치질을 구성하는 수산화인회석과도 우수한 결합력을 보여주어 치태 억제제로의 사용 가능성이 높다는 것이다. Son 등<sup>23)</sup>은 실험적 치은염 모델의 in vivo 실험에서 20cc의 1 unit *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase 함유 용액을 1일 2회 30초간 3주 동안 흡수한 경우 chlorhexidine 사용군보다 치태 형성 및 치은염 억제 효과가 크게 관찰되었다고 하였고, Song 등<sup>24)</sup>도 glucanhydrolase 함유 용액을 이용한 6개월간의 임상 연구 결과 chlorhexidine 사용군에 비하여 치은염 예방에 효과적이었다고 보고하였다. 그러나 구강세정



제로 개발되기 위해서는 구강 조직 및 세포에 대한 안전성이 확인되어야 하는데 세포독성 등의 연구는 아직 이루어진 바 없는 실정이다.

따라서 이번 연구에서는 항치태효과가 보고된 *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase 함유 용액이 건강한 성인에서 채취한 치은 섬유아세포에 유해한 영향을 가지는지 알아보려고 하였다.

Glucanhydrolase 용액의 세포 부착에 대한 영향을 관찰하기 위하여 세포를 분주한 직후 각각의 시험 용액을 배지에 첨가하여 배양한 다음 세포 형태 관찰 시 계속 원형의 세포 형태를 보여준 0.1% chlorhexidine 처치군과 달리 glucanhydrolase 처치군에서는 3 시간 배양 후 방추상의 부착 세포 수가 서서히 증가하였고 정상적인 배지에서 배양한 대조군과 유사한 형태를 보여주었다. 세포 부착도 측정 결과 부착 세포 수는 glucanhydrolase 처치군에서 분주 30 분 후 대조군의 약 70%, 분주 세포 대비 약 29%의 세포가 부착되어 대조군에 비해 낮은 수준을 보여주었으나 6 시간 경과 후에는 최초 분주 세포의 95~103%가 부착되는 등 대조군과 유사한 부착 수준을 보여주었다. 부착 세포 활성화 측정에서도 같은 결과를 보여주었으며 glucanhydrolase 농도에 따른 차이는 유의하지 않았다. 부착된 단위 세포당 활성화도는 분주 1.5 시간 경과 후부터 24 시간 경과 시까지 큰 차이 없이 비슷한 수준을 유지하여서 glucanhydrolase가 세포 활성화에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 생각할 수 있으며, 단위 세포당 활성화도가 아닌 전체 부착 세포 수의 증가로 인해 전체 MTT 활성화도의 수치가 증가되었음을 알 수 있었다.

그러나 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 분주 30 분 후부터 24 시간 경과 후까지 대조군의 10%에 못 미치는 부착양상을 보여주었다. 이는 기존의 chlorhexidine의 세포 독성에 대하여 보고한 다른 연구의 결과와 크게 다르지 않았다. 즉 Goldschmidt<sup>7)</sup> 등은 인간의 치은 섬유아세포에 대한 chlorhexidine의 세포 독성을 관찰한 연구에서 0.004% chlorhexidine에 노출된 세포에서 단백질 합성이 감소되며 0.2% chlorhexidine에서 가장 큰 억제 효과가 나타남을 보고하였고, Pucher와 Daniel<sup>8)</sup>은 0.002 ~ 0.12%

chlorhexidine을 배양된 인간의 치은 섬유아세포에 노출시킨 결과 0.002%에서도 세포 분열, 단백질 합성 등에 대해서 높은 세포 독성을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Mariotti와 Rump<sup>9)</sup>은 인간의 치은 섬유아세포에 대한 chlorhexidine의 연구에서 0.0009% chlorhexidine에서도 교원질과 비교원질의 단백질 합성이 억제됨을 보고하였다. 이번 실험에서 사용한 0.1% chlorhexidine은 임상적으로 흔히 사용되는 농도로 세포 실험에서는 독성을 나타내는 농도이다. In vitro 실험에서는 이보다 100배 낮은 농도에서도 세포 분열 억제와 단백질 합성이 억제됨이 여러 차례 보고된 바 이번 실험에서 0.1% chlorhexidine에서 대조군에 비하여 유의하게 낮은 수준의 세포 부착도와 활성도를 보이는 것은 예상된 결과였다. 그러나 0.1% chlorhexidine 처치군의 단위 세포당 활성화도 관찰 결과 사용한 strain에 따라 서로 상이한 결과를 보여주었다. 20대 흡연 남성에서 얻은 세포인 strain 1에서는 단위 세포당 활성화도가 부착 초기단계에 증가했다가 감소하였고 다시 증가하는 등 불안정한 양상을 보여주었다. 그러나 10대 후반 비흡연 여성에서 유래한 치은 섬유아세포인 strain 2에서는 분주 3 시간 경과 후 증가되었으며 총 활성화도는 strain 1에서 strain 2보다 더 높게 나타났다. 이에 대해서는 여러 이유가 있을 수 있으며 세포제공자의 성별과 연령, 흡연 여부의 차이가 기여하리라 추정되는데, 즉 비흡연자의 세포가 초기에 영향을 많이 받지만 시간경과에 따라 환경에 적응하는 것으로 보인다. 지금까지의 다른 보고를 보면 여러 strain을 사용한 연구는 많았으나 strain별로 나타낸 보고는 거의 없었으며 제공자에 따른 세포의 특성 차이에 대해서는 더욱 많은 연구가 필요하다.

세포 증식 실험에서는 실제 일상 생활에서 구강 세정제 사용법을 모방하기 위하여 아침, 저녁으로 1일 2회씩, 배지를 제거한 후 glucanhydrolase와 chlorhexidine에 1분 동안 노출시킨 후 다시 배지를 첨가하는 방식을 선택하였다. 관찰 결과 2일 후와 7일 후 증식 세포 수는 대조군과 glucanhydrolase 처치군 모두 증가 양상을 보여주었으며 세포 활성화도도 함께 증가되었다. 단위 세포당 활성화도는 2일과 7일 후



유사한 수준을 유지함을 미루어 볼 때 부착 실험시와 마찬가지로 증가된 세포 활성도는 개개의 세포 활성도의 증가보다는 세포 수 증가에 의한 것으로 추정된다. Mariotti와 Cochran<sup>26)</sup>은 인간의 치은 섬유아세포에 대한 특성 연구에서 분주 2일에서 4일 사이에 가장 급속한 세포 증식이 일어나 분주 시 세포수의 약 세 배에 도달하며 4일 이후에는 완만하게 증가한다고 하였고, Ogata<sup>27)</sup> 등도 역시 분주 4일 후까지에 급속한 세포 증식을 보여 세포 수가 분주 시의 2배 이상이 된다고 하였다. 이번 실험에서의 결과를 보면 대조군과 glucanhydrolase 처치군 모두에서 처음에 접종한  $1 \times 10^4$  세포 수가 2일 후 약 1.4~1.7배, 총세포 활성도는 약 1.6~2배로 증가하였고, 7일 후 약 세 배로 증가하여 기존의 다른 연구와 비슷하였다.

세포부착 실험 결과와 마찬가지로 증식 실험에서도 대조군과 glucanhydrolase 처치군에서의 두 strain은 세포 수와 세포 활성도가 유사하였지만 0.1% chlorhexidine 처치군에서는 세포당 활성도가 strain 1에서는 증가, strain 2에서는 감소하는 상반된 경향을 보여주었다. 이는 부착 실험 결과에서와 마찬가지로 내외적 요인이 기여했으리라 추정된다.

이상의 연구결과로부터 *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase는 치은 섬유아세포에 대한 세포 부착과 증식에 대해 억제 효과가 거의 없음을 알 수 있었고 이로 미루어 보아 세포 독성이 없다고 유추되었다. *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase를 함유한 구강 세정액이 기왕의 연구를 통하여 chlorhexidine과 유사하거나 더 나은 치태 축적과 치은염 억제 효과를 가지고 있는 것으로 보고되었고 이번 연구의 결과로 세포 독성이 없음을 비추어 볼 때 chlorhexidine을 대체하여 치주질환 예방과 치아 우식증 예방에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대되어 제품 개발이 유용할 것으로 사료된다.

## V. 결론

*Lipomyces starkeyi* KSM 22에서 유래한 glucanhydrolase이 건강한 성인에서 채취한 치은 섬유아세포

에 유해한 영향을 가지는지 알아보고자 0.5, 1, 2 unit 농도의 glucanhydrolase 용액, chlorhexidine액을 사용한 경우 세포 형태 변화와 부착도, 부착 세포의 활성도를 비교한 결과는 다음과 같다.

1. *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase 용액에 노출된 세포의 형태는 부착 초기 원형에서 점차적으로 방추형으로 변하여 모든 관찰 기간 동안 대조군과 유사한 형태를 보여주었으나 0.1% chlorhexidine에 노출된 세포는 시간이 경과하여도 원형을 유지하였다.
2. 세포 부착도와 부착 세포 활성도는 glucanhydrolase 처치군이 배양 3시간 이후 모든 농도에서 대조군과 유사한 양상을 보여주었으며 0.1% chlorhexidine 처치군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았다.
3. 세포 증식도는 glucanhydrolase 처치군은 7일 후 대조군과 유사하였으며 0.1% chlorhexidine 처치군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높았다.

이상과 같이 *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase의 치은 섬유아세포에 대한 세포 독성을 관찰한 결과 세포의 형태 변화, 부착과 증식, 활성도 측면에서 치은 섬유아세포에 대한 독성이 현저한 chlorhexidine과 달리 *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase는 치은 섬유아세포의 부착과 증식에 거의 영향을 주지 않으며 세포 활성도에도 큰 영향을 미치지 않았으며 이로 미루어보아 차후 새로운 구강 세정제로서의 개발 가능성이 클 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Lobene R. Clinical status of plaque control agents: An overview. *J Dent Res* 58: 2381-2388, 1979.
2. Johnson R, Rozanis J. A review of chemotherapeutic plaque control. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 47: 136-141, 1979.
3. Hull P. Chemical inhibition of plaque. *J Clin*

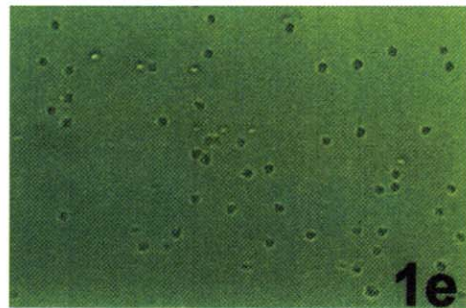
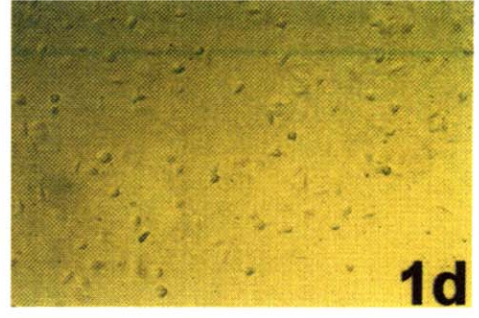
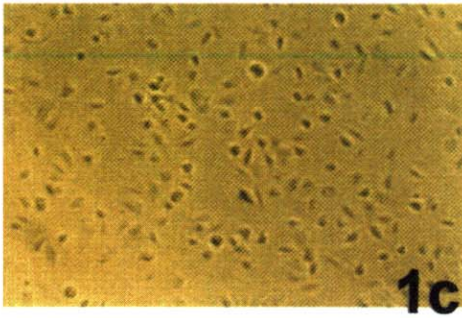
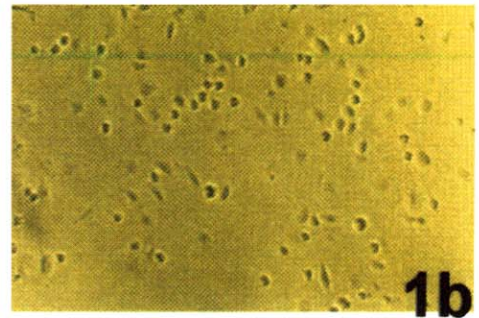
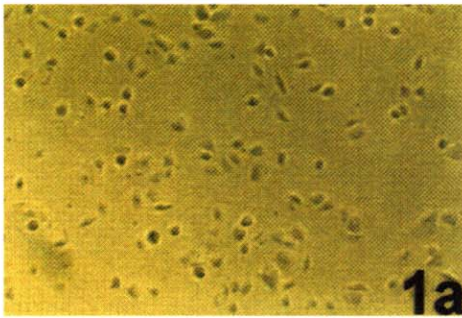
- Periodontol* 7:431-442, 1980.
4. Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB, De la Rosa MR, Isaacs RL, Lang NP, Mallatt ME, Meckel AH. A Comparison of mouthwashes containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodont Res* 21(Suppl 16): 23-32, 1986.
  5. 류인철. 수종의 상용 세치제들의 항균 및 항염효과 비교 연구. *대한치주과학회지* 26:557-565, 1996.
  6. Banting D, Bosma M, Bollmer B. Clinical effectiveness of a 0.12% chlorhexidine mouth rinse over two years. *J Dent Res* 68:1716-1718, 1989.
  7. Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 48: 212-215, 1977.
  8. Pucher J, Daniel J. The effect of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 62:526-532, 1993.
  9. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 70:1443-1448, 1999.
  10. Block P, Dooley C, Howe E. The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. *J Periodontol* 40:105-110, 1969.
  11. Lobene R. A clinical study of the effect of dextranase on human dental plaque. *J Am Dent Assoc* 82: 132-135, 1971.
  12. Caldwell R, Sandham HJ, Mann W, Finn S, Formicola A. The effect of a dextranase mouth wash on dental plaque in young adults and children. *J Am Dent Assoc* 82: 124-131, 1971.
  13. Walker G. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: Release of Dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. *J General Microbiol* 127: 201-208, 1981.
  14. Takada K, Shiota T, Curtiss R III, Michalek S. Inhibition of plaque and caries formation by a glucan produced by *Streptococcus mutans* mutants UAB108. *Infect Immun* 50: 833-843, 1985.
  15. Johnson I. Dextranase activity of streptococcal isolates from human dental plaques. *Microbios* 65: 264-265, 1991.
  16. Wellington J, Shaw J, Walker G. Influence of growth rate on the relative activities of free and bound dextranase and dextranase inhibitor in continuous cultures of *Streptococcus sobrinus*. *Microbios* 79: 121-129, 1994.
  17. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Characterization of the Dextranase gene(*dex*) of *Streptococcus mutans* and its recombinant product in an *Escherichia coli* host. *Microbiol Immunol* 39: 387-391, 1995.
  18. Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Detection of dextranase-producing gram-negative oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 13:382-386, 1998.
  19. Kim DM, Day DF. A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* KSM and *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme Microb Technol* 16:844-848, 1994.
  20. Kim DM, Day DF. Isolation of a dextranase constitutive mutants of *Lipomyces starkeyi* and its use for the production of clinical size dextran. *Letters in Applied Microb* 20: 268-270, 1995.
  21. Kim DM, Ryu SJ, Heo SJ, Kim DW, Kim HS. Characterization of a novel carbohydrase from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 for dental application. *J Microbiol Biotechnol* 9:260-264, 1999.
  22. Ryu SJ, Kim DM, Ryu HJ, Chiba S, Kimura A, Day DF. Purification and partial characterization of a novel glucanhydrolase from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 and its use for inhibition of insoluble glucan formation. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:223-228, 2000.
  23. 손은주, 김영준, 김도만, 정현주. 실험적 치은염

- 에서 dextranase 함유 구강 세정액의 양 치 효과. 대한치주과학회지 31:401-420, 2001.
24. 송우성, 손은주, 김도만, 정현주. Dextranase 함유 구강 세정액의 치태 제거 및 치은염 예방 효과에 관한 임상적 연구. 대한치주과학회지 31: 371-388, 2001.
  25. Sommerman MJ, Archer SY, Foster RA. A comprehensive study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblast *in vitro*. *J Dent Res* 67:66-70, 1988.
  26. Mariotti AJ, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* 61:103-111, 1990.
  27. Ogata Y, Naomi N, Takeshi S, Furuyama S, Sugira H. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol* 66: 1025-1031, 1995.

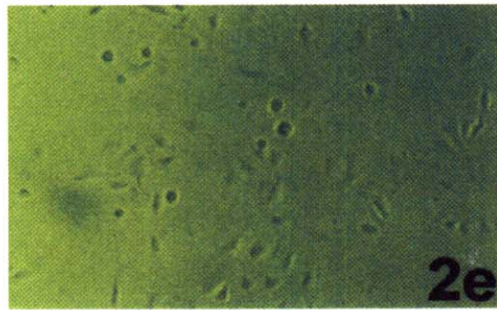
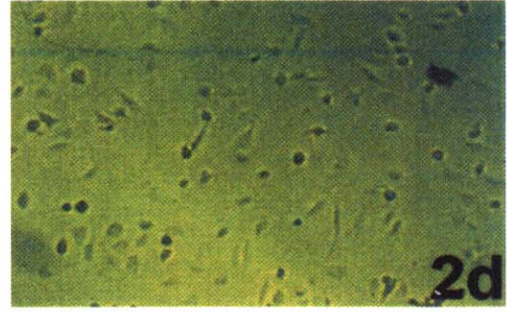
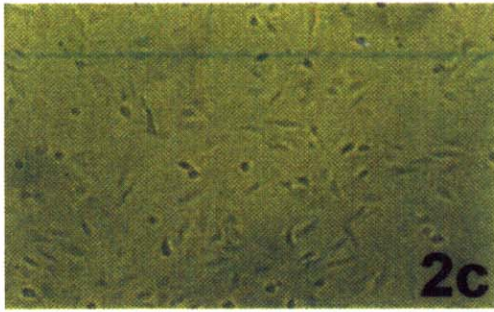
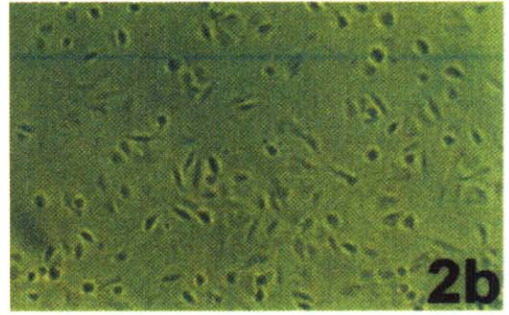
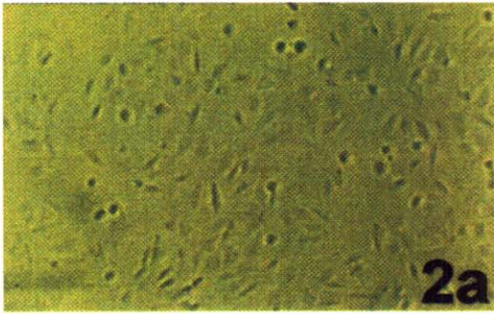
## 사진부도 설명

- Figure 1      Photography on cell attachment after 1,5 hour of incubation (x100)  
a. control  
b. glucanhydrolase 0,5 u  
c. glucanhydrolase 1 u  
d. glucanhydrolase 2 u  
e. 0,1% chlorhexidine
- Figure 2      Photography on cell attachment after 3 hours of incubation (x100)  
a. control  
b. glucanhydrolase 0,5 u  
c. glucanhydrolase 1 u  
d. glucanhydrolase 2 u  
e. 0,1% chlorhexidine
- Figure 3      Photography on cell attachment after 6 hours of incubation (x100)  
a. control  
b. glucanhydrolase 0,5 u  
c. glucanhydrolase 1 u  
d. glucanhydrolase 2 u  
e. 0,1% chlorhexidine
- Figure 4      Photography on cell attachment after 24 hours of incubation (x100)  
a. control  
b. glucanhydrolase 0,5 u  
c. glucanhydrolase 1 u  
d. glucanhydrolase 2 u  
e. 0,1% chlorhexidine
- Figure 5      Photography on cell proliferation after 7 days of incubation (x100)  
a. control  
b. glucanhydrolase 0,5 u  
c. glucanhydrolase 1 u  
d. glucanhydrolase 2 u  
e. 0,1% chlorhexidine

사진부도 (1)

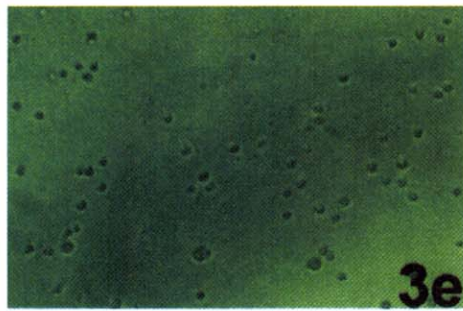
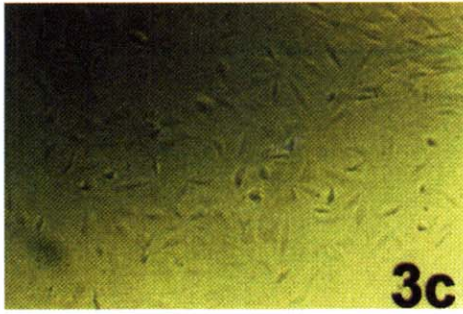


사진부도 (II)



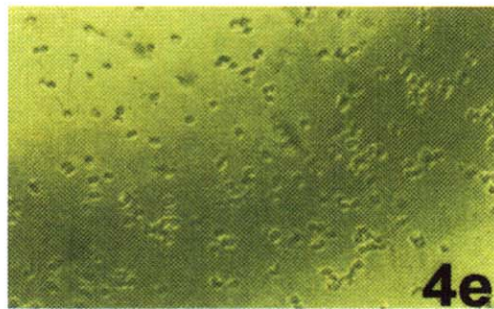
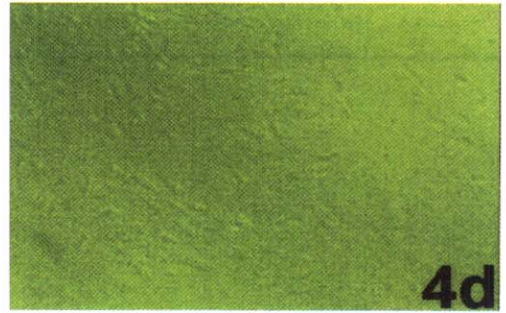
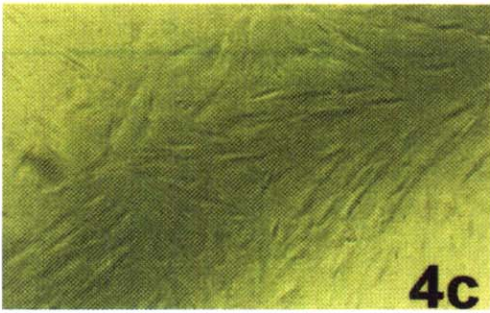
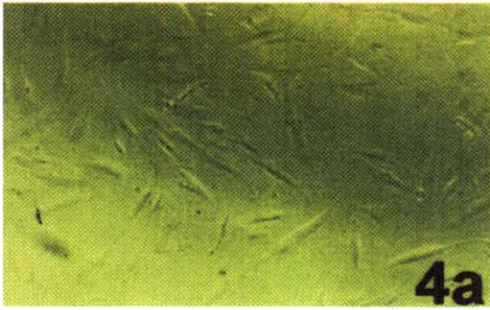


사진부도 ( III )





사진부도 (IV)



사진부도 (V)



## Effects of *Lipomyces starkeyi* KSM 22 Glucanhydrolase on human gingival fibroblasts

Hyun-Jeong Yun, Hyun-Ju Chung, Ok-Su Kim, Do-Man Kim\*

Department of Periodontology, College of Dentistry and Dental Science Research Institute,  
Department of Biochemical Engineering\*, College of Engineering Chonnam National University, Gwangju, Korea

A novel glucanhydrolase from a mutant of *Lipomyces starkeyi* KSM 22 has additional amylase activity besides mutanolytic activity and has been suggested as promising anti-plaque agent. It has been shown effective in hydrolysis of mutan, reduction of mutan formation by *Streptococcus mutans* and removal pre-formed sucrose-dependent adherent microbial film and has been strongly bound to hydroxyapatite. These in vitro properties of *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase are desirable for its application as a dental plaque control agent. In human experimental gingivitis model and 6 month clinical trial, mouthrinsing with *Lipomyces starkeyi* KSM 22 dextranase was comparable to 0.12% chlorhexidine mouthwash in inhibition of plaque accumulation and gingival inflammation and local side effect was negligible.

This study was aimed to evaluate the cytotoxic effect of *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase on human gingival fibroblasts. Primary culture of human gingival fibroblasts at the 4th to 6th passages were used. Glucanhydrolase solution was made from lyophilized glucanhydrolase powder from a mutant of *Lipomyces starkeyi* KSM 22 solved in PBS and added to DMEM medium to the final concentration of 0.5, 1, and 2 unit. Cells were exposed to glucanhydrolase solution or 0.1 % chlorhexidine and the cells cultured in DMEM with 10% FBS and 1% antibiotics as control. After exposure, the morphological change, cell attachment, and cell activity by MTT assay were evaluated in 0.5, 1.5, 3, 6, 24 hours after treatment. The cell proliferation and cell activity was also evaluated at 2 and 7 days after 1 minute exposure, twice a day.

The cell morphology was similar between the *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase groups and control group during the incubation periods, while most fibroblasts remained as round cell regardless of incubation time in the chlorhexidine group. The numbers of the attached cells in the glucanhydrolase groups were comparable to that of control and significantly higher than the chlorhexidine group. The numbers of the proliferated cells in the glucanhydrolase groups at 7 days of incubation were comparable to the control group and higher than the chlorhexidine group. The cell activity in glucanhydrolase groups paralleled with the increased cell number by attachment and proliferation.

According to these results, *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase has little harmful effect on attach-

ment and proliferation of human gingival fibroblasts, in contrast to 0.1% chlorhexidine which was cytotoxic to human gingival fibroblasts. Therefore this glucanhydrolase preparation is considered as a safe and promising agent for new mouthwash formula in the near future.

---

Key words : *Lipomyces starkeyi* KSM 22 glucanhydrolase, chlorhexidine, human gingival fibroblasts, cytotoxic