

백질려 추출물이 *Streptococcus mutans*에 대한 항치아우식에 미치는 영향

이다홍 · 유현희¹ · 정수영² · 문해닮아² · 김수민² · 전병훈³ · 유용욱^{2*}

원광대학교 식품영양학과, 1: 군산대학교 식품영양학과, 2: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실,
3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Anticariogenic Properties of the Ethanol Extract of *Tribuli fructus* against *Streptococcus mutans*

Da Hong Lee, Hyeon Hee Yu¹, Su Young Jung², Hae Dalma Moon², Su Min Kim²,
Byung Hun Jeon³, Yong Ouk You^{2*}

Department of Food and Nutrition, Wonkwang University, 1: Department of Food and Nutrition, Kunsan National University,
2: Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University,
3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Streptococcus mutans is considered one of the primary etiologic agents of dental caries. we studied the effect of the ethanol extracts of *Tribuli fructus* (*T. fructus*) on the growth, biofilm formation, acid production, adhesion and insoluble glucan synthesis of *S. mutans*. The ethanol extracts of *T. fructus* showed concentration dependent inhibitory activity against the growth and acid production of *S. mutans*, and produced significant inhibition at the concentration of 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml compared to the control group. In the biofilm assay, the ethanol extracts of *T. fructus* inhibited formation of biofilm synthesized by *S. mutans* at the concentration of 0.05 mg/ml. The extracts markedly inhibited *S. mutans* adherence to HA treated with saliva, and cell adherence was repressed by more than 50% at the concentration 0.05 mg/ml. On the activity of glucosyltransferase which synthesizes water insoluble glucan form sucrose, ethanol extract of *T. fructus* showed more than 10% inhibition over the concentration of 0.025 mg/ml. Hence, we conclude that *T. fructus* might be a candidate of anticaries agent. Further studies are necessary to clarify the active constituents of *T. fructus* responsible for such biomolecular activities.

Key words : Dental caries, *Streptococcus mutans*, *Tribuli fructus*

서 론

문명의 발달 속에서도 꾸준히 증가하는 치아우식증의 예방을 위해서는 그 발생의 주된 원인이라 할 수 있는 치면세균막의 관리가 가장 중요하다고 볼 수 있다.

구강 내에 생존하는 균 중에 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)가 생성하는 비수용성 글루칸 미생물들, 음식물 잔사 등이 서로 엉켜, 치면에 치태라고 하는 치면 세균막을 형성한다. 또한 이들 미생물들의 대사산물인 각종 산에 의해 구강 내 pH를

5.50이하로 낮추어 치아의 법랑질층의 무기질 성분들이 탈회되어 치아우식증이 발생한다¹⁻³⁾. *S. mutans*가 치아의 표면위에서 성장하여 층을 형성하고, 그들 스스로 polysaccharide나 glycoprotein을 분비하여 형성된 biofilm은 구강 내에서 전형적인 형태는 치면세균막으로써 구강질환인 치아우식증과 치주질환을 일으킨다. 치주질환은 일차적으로 복합적인 biofilm 덩어리로 구성된 혼합된 세균성 공동응집체에 의해 시작된다^{4,5)}. 또한 *S. mutans*가 생산하는 GTFase는 자당을 기질로 하여 점착성의 비수용성 글루칸을 합성하는 반응을 촉매한다. 이 점착성 비수용성 글루칸은 *S. mutans*를 치면에 부착시켜 다른 미생물을 끌어들이고, 치면에 서의 부착, 증식을 가능하게 한다⁶⁻⁸⁾.

치아우식증을 예방할 수 있는 구강관리법으로 잇솔질⁹⁾, 구

* 교신저자 : 유용욱, 익산시 신용동 344-2, 원광대 치과대학 구강생화학교실

· E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6926

· 접수 : 2007/08/27 · 채택 : 2007/09/18

강양치용액¹⁰⁾, chlorhexidine gluconate 사용¹¹⁾, penicillin과 erythromycin 의 항생제 사용¹²⁾, 불소 화합물의 이용법¹³⁻¹⁶⁾, 불소를 방출하는 여러 장치와 재료들이^{17,18)} 개발되어 소개되어 왔으나, 이러한 기존에 사용되는 화학적 보조구강용품 등은 장기간 사용시 부작용을 가지고 있기 때문에 구강 내 강력한 항균작용을 하면서도 신체 부작용이 없는 안전한 천연약제 개발의 필요성이 필요하다.

전통약제들인 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 강활(*Ostericum koreanum*), 결명자(*Cassia tora*), 구기자(*Lycium chinense*), 오미자(*Schzandera chinensis*), 질경이(*Plantago brachycarpa*), 치자(*Gardenia jasminoide*), 향부자(*Cyperus rotundus*)등 많은 식물에서 항균효과를 발견하였고¹⁹⁾, 녹차(*Theae follium*), 불약(*Myrrha*), 상백피(*Mori radicis cortex*), 승마(*Cimicifugae rhizoma*), 인삼 사포닌(*Ginseng Saponine*)등의 천연 추출물에서는 구강 내 염증 완화, 소염, 진통의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다^{20,21)}. 특히 상백피 추출물의 주성분인 Sanggenon C는 *S. mutans*의 대사 저해로 glucan의 형성을 줄여 치대형성의 제 1 단계인 균 부착을 방해한다 하였으며²²⁾, 녹차의 성분인 polyphenol류는 동물실험에서 치아우식 유발을 억제하는 보고가 있었다²³⁾.

백질려(*Tribulus fructus*)는 남가새 혹은 질려자로 불리며, 한방에서 혈압강하, 심혈관계 작용, 항노화 및 강장작용 등의 효과를 나타내었다. 최근 들어 백질려의 고유한 생리활성을 이용하여 여러 질환에 응용하고자 하는 연구가 진행되어 왔다²⁴⁾. 그러나 치아 우식과 관련된 백질려의 기능은 아직 활발히 연구되지 않는 부분으로서 앞으로 많은 연구가 필요하다. 따라서 본 연구는 백질려 에탄올 추출물에서의 항치우식 활성을 알아보기 위해 *S. mutans*의 성장과 산 생성, biofilm 형성 억제, saliva coated hydroxyapatite bead에 부착억제, 비수용성 글루칸 형성억제 효과를 관찰하여 치아 우식증 원인균에 대해 효과가 있는지를 알아보자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

1) 백질려 추출물 준비

백질려는 익산 대학한약국에서 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 건조하여 세척한 백질려 100 g을 에탄올 1 L로 상온에서 3일간 2회 추출하여 에탄올 추출물을 1.11 g (1.11%)를 얻었다.

2) 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *S. mutans* ATCC 25175로 brain heart infusion (BHI, Difco, USA) 액체배지에 1-2차 계대배양 후 같은 배지에 식균하여 37°C의 항온기에서 24시간 배양하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 실험

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 백질려 에탄올 추출물을 첨가한 후 균을 5×10^5 CFU/ml/well이 되게 접종하였다. 37°C의 항온기에서 24시간 배양한 후 BHI 액체배지를 기준으로

ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, pH meter (HANNA instrument, philippines)를 이용하여 pH를 측정하여 산 생성 억제 효과를 관찰하였다. 대조군은 백질려 추출물을 넣지 않고 시행하였다.

2) Biofilm 형성 억제 실험

O'Toole 과 Kolter²⁵⁾의 방법을 응용하여 polystyrene 24-well plate (Nunc, Copenhagen, Denmark)를 이용하였다. 1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 백질려 에탄올 추출물을 첨가한 후 균을 5×10^5 CFU/ml/well이 되게 접종하였다. 37°C의 항온기에서 48시간 배양한 후 상청액을 모두 제거하였다. 각각의 well에 멸균증류수 1 ml 씩 넣어 washing 후, 0.1% safranine 용액 500 μl를 넣어 30초 동안 염색하고 멸균증류수로 2회 washing 한다. 각 well에 30% Acetic acid를 250 μl씩 넣은 후, 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) S-HA에 부착 억제 실험

Hydroxyapatite beads (Bio-Rad Lab., U.S.A.) 30 mg을 증류수로 5회 세척하여 작은 입자를 제거한 후 37°C에서 건조시켜 사용하였다. 건조된 hydroxyapatite bead 30 mg을 1 ml의 타액으로 37°C에서 60분간 처리하여 타액을 bead에 코팅시켰다. 그 후 S-HA를 0.1 M potassium phosphate buffer (KPB, pH 7.0)으로 3회 세척한 후 백질려의 에탄올 추출물을 각각의 농도별로 넣고, *S. mutans*를 1×10^7 CFU/ml이 되게 넣은 다음 37°C의 흔들리는 배양기에서 90분 동안 S-HA에 부착시켰다. 그 후 0.1 M KPB (pH 7.0)로 3회 세척한 후 초음파 장치 (50W, 30초)를 이용해 S-HA에 부착된 균을 떨어지도록 하였다. 그 다음 균액을 희석하여 mitis salivarius agar plate (Difco Laboratories, U.S.A.)에 도말하여 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양시켜 집락수를 세웠다. 대조군은 백질려 추출물을 넣지 않고 시행하였다.

4) Glucosyltransferase (GTFase)의 준비

다음과 같은 방법으로 GTFase를 얻는다. *S. mutans*를 BHI 액체배지 2 L에 배양한 후, 원심분리 (15,000 rpm, 4°C, 20분)하여 단백질을 가라앉혔다. 이 단백질에 0.1 M KPB (pH 6.0)을 4 시간마다 바꾸어주며, 4°C에서 24시간동안 투석시킨 후 냉동보관 (-80°C)하였다가 사용하였다.

5) GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제능 검사

0.04% sodium azide를 첨가한 0.04 M KPB (pH 6.0)을 0.25 ml 취하여, 0.25 ml의 0.4 M자당용액, 0.25 ml의 각 농도별 백질려 에탄올 추출물을 넣고, GTFase를 넣어 최종 1 ml이 되게 하였다. 이를 37°C에서 18시간 배양한 후 증류수로 세척하고 5% phenol을 1 ml, 진한 H₂SO₄를 5 ml 넣어준 후 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices Co., CF., U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시험물질을 넣지 않은 군으로 하였다.

3. 통계처리

실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험군)/대조군]×100의 식을 이용하여 계산하였다. 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여 평균과 표준오차로 제시하였

고, $\alpha=0.05$ 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 independent sample t-test로 유의성을 검증하였다.

성 적

1. 백질려 에탄올 추출물의 *S. mutans* 성장 억제에 미치는 효과
 백질려 에탄올 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 백질려의 에탄올 추출물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 백질려 추출물을 넣지 않은 대조군에서는 0.554 ± 0.0536 흡광도를 나타내었다. 에탄올 추출물 0.025 mg/ml 농도에서는 0.492 ± 0.0418 , 0.05 mg/ml 농도에서는 0.489 ± 0.0427 , 0.1 mg/ml 농도에서는 0.394 ± 0.0326 , 0.2 mg/ml에서는 0.269 ± 0.0321 , 0.3 mg/ml 농도에서는 0.234 ± 0.0320 , 0.5 mg/ml 농도에서는 0.200 ± 0.0321 를 나타내었다. 백질려 에탄올 추출물을 첨가한 실험군의 흡광도 값은 대조군에 비해 0.025 mg/ml 농도 이상에서 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 낮아져 성장 억제 효과를 보였다($p<0.05$).

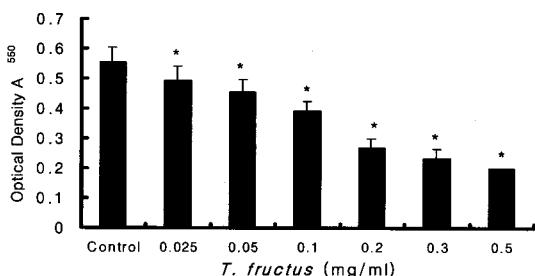


Fig. 1. The optical density of *S. mutans* by various concentrations of ethanol extract of *T. fructus*. The optical density of A₅₅₀ were read by a spectrophotometer. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

2. 백질려 에탄올 추출물의 *S. mutans* 산 생성 억제에 미치는 효과
 백질려 에탄올 추출물 첨가에 따른 *S. mutans*에 의한 유기산 생성 억제 효과를 알아보기 위해 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도의 시료에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양 후에 pH meter로 pH를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 백질려 추출물을 넣지 않은 대조군에서 pH는 5.47 ± 0.04 를 나타내었다. 백질려 추출물은 0.025 mg/ml 농도에서 5.27 ± 0.10 , 0.05 mg/ml 농도에서는 5.33 ± 0.04 , 0.1 mg/ml 농도에서는 5.43 ± 0.04 , 0.2 mg/ml 농도에서는 5.47 ± 0.08 , 0.3 mg/ml 농도에서는 7.23 ± 0.04 , 0.5 mg/ml 농도에서는 7.30 ± 0.07 을 나타내었다. 백질려의 에탄올 추출물의 pH값은 대조군의 pH 값에 비해 0.3 mg/ml 이상 농도에서 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 높아졌으며 ($p<0.05$), 특히 0.3 mg/ml 농도 이상에서는 차이 우식증에서 무기질 재광화가 일어나는 임계 pH 5.5 이상을 나타냈다.

3. 백질려 에탄올 추출물의 biofilm 형성 억제에 미치는 효과

백질려 추출물이 biofilm 형성 억제 효과가 있는지 알아본 결과는 Fig. 2와 같다. 에탄올 추출물은 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 각각의 농도에서 0.752 ± 0.152 , 0.458 ± 0.053 , 0.390 ± 0.024 , 0.300 ± 0.012 , 0.250 ± 0.011 , 0.200 ± 0.012 의 흡광도를 보였으며, 대조군에서는 0.853 ± 0.167 의 흡광도를 값을 보였으며, 각각 88.2%, 53.7%, 45.7%, 35.2%, 29.7%, 23.4%의 생성율을 보였다. 백질려 추출물의 농도가 높아질수록 생성율이 점차 작아져 biofilm 형성 억제 효과를 보였다. 특히 0.05 mg/ml 이상 농도에서 백질려 에탄올 추출물의 biofilm 형성 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 즉, 실험군은 대조군과 비교해 보았을 때 각각의 농도에서 11.8%, 46.3%, 54.3%, 64.8%, 70.3%, 76.6%의 biofilm 형성 억제율을 보였다.

Table 1. The pH of *S. mutans* by the various concentrations of ethanol extract of *T. fructus*

Conc. (mg/ml)	pH
Control	$5.47 \pm 0.04^{\dagger}$
0.025	5.27 ± 0.10
0.050	5.33 ± 0.04
0.10	5.43 ± 0.04
0.20	5.47 ± 0.08
0.30	$7.23 \pm 0.04^*$
0.50	$7.30 \pm 0.07^*$

1) Value represent the Mean±SE obtained from triplicate experiment. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

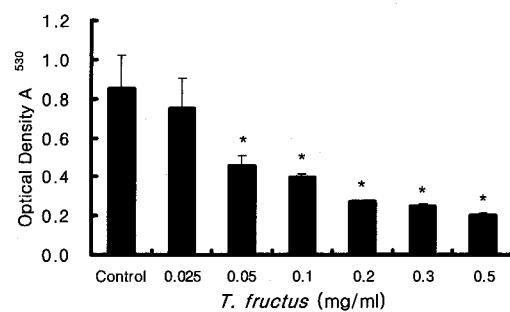


Fig. 2. The optical density of biofilm formation of *S. mutans* by the various concentration of ethanol extract of *T. fructus*. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

4. 백질려 에탄올 추출물의 S-HA 부착 억제에 미치는 효과

백질려 에탄올 추출물이 S-HA에 *S. mutans* 부착 억제 효과가 있는지 알아본 결과 대조군은 $400 \pm 66 (\times 10^3)$ CFU/ml이었으며, 에탄올 추출물 0.025 mg/ml 농도에서는 $380 \pm 18 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.05 mg/ml 농도에서는 $100 \pm 4 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.1 mg/ml 농도에서는 $70 \pm 4 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.2 mg/ml 농도에서는 $67 \pm 3 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.3 mg/ml 농도에서는 $66 \pm 3 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.5 mg/ml 농도에서는 $65 \pm 3 (\times 10^3)$ CFU/ml로 0.05 mg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 S-HA에 부착하는 균수가 농도 의존적으로 유의한 차이를 보였으며 ($p<0.05$), 대조군에 비해 각각 5.0%, 75.0%, 82.5%, 83.3%, 83.5%, 83.8%의 부착 억제율을 보였다.

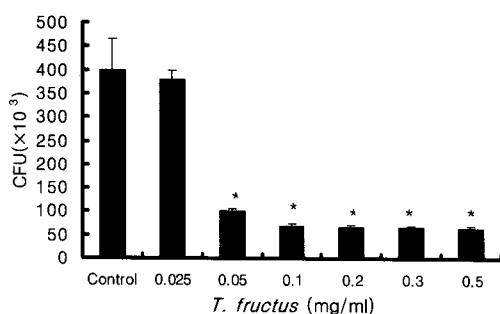


Fig. 3. The colony forming unit(CFU) of *S. mutans* to the 30 mg saliva-coated hydroxyapatite beads by various concentrations of ethanol extract of *T. fructus*. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

5. 백질려 에탄올 추출물의 GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 효과

백질려 추출물이 비수용성 글루칸 합성 저해 효과가 있는지 알아본 결과는 Fig. 4와 같다. 에탄올 추출물은 대조군 ($100\pm5.65\%$)에 비해 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 각각의 농도에서 $90\pm5.17\%$, $84\pm4.70\%$, $67\pm4.39\%$, $65\pm3.18\%$, $62\pm3.18\%$, $60\pm3.17\%$ 의 생성율을 보였으며, 특히 0.025 mg/ml 이상 농도에서 백질려 추출물이 비수용성 글루칸 합성 저해 효과를 알 수 있었다($p<0.05$). 즉, 실험군은 대조군과 비교해 보았을 때 각각의 농도에서 10.0%, 16.0%, 33.0%, 35.0%, 38.0%, 40.0%의 비수용성 글루칸 합성 억제율을 보여서 백질려의 에탄올 추출물이 치아우식에 직접적인 영향을 준다고 할 수 있었다.

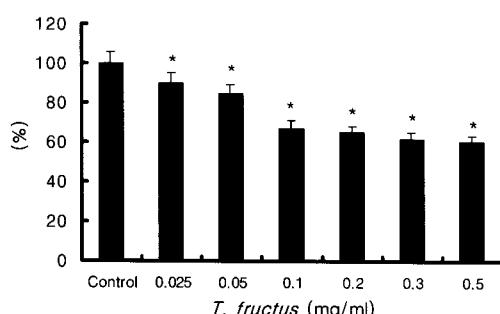


Fig. 4. Rate of insoluble glucan synthesis of *S. mutans* by the various concentration of ethanol extract of *T. fructus*. * $p<0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

고 찰

구강에 나타나는 여러 질환 중에서도 치아 우식증은 나이와 성별에 관계없이 인간에게 가장 흔한 질병으로 알려져 있으며, 이에 치아우식 예방과 치료에 관한 연구와 노력이 끊임없이 계속되고 있다. 이러한 치아 우식증의 원인은 구강 내의 세균들이 탄수화물을 분해하여 생성되는 산이 치아의 무기질과 유기질을 차례로 봉괴시키고 탈회과정을 일으키는 세균들 중 가장 우식

유발성이 강한 것이 바로 연쇄상 구균인 *S. mutans*이다²⁾. 또한 치과 치료의 연구로 치아 우식증의 예방에 도움이 되는 물질 중 여러 천연물이 개발되고 있다. 이에 본 연구에서는 백질려의 항균 효과를 알아보기 위하여 에탄올로 추출하여 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml의 농도별로 *S. mutans*에 대한 성장억제 효과를 관찰한 결과, *S. mutans*의 성장률이 대조군에 비하여 에탄올 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도에서 각각 11.2%, 11.7%, 28.9%, 51.4%, 57.7%, 63.9%의 성장억제 효과를 나타내었다. 또한 백질려 에탄올 추출물을 넣지 않은 대조군에서 pH는 5.47 ± 0.04 를 나타내었고, 백질려 에탄올 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도에서, 각각 5.27 ± 0.10 , 5.33 ± 0.04 , 5.43 ± 0.04 , 5.47 ± 0.08 , 7.23 ± 0.04 , 7.30 ± 0.07 을 나타내어 0.3 mg/ml 이상 농도에서는 우식임계 pH 5.5에 넘어선 효과를 나타내었다. 백질려의 농도가 증가함에 따라 pH가 증가하는 것으로 보아 백질려 에탄올 추출물이 *S. mutans*에 의한 유기산 생성을 억제하여 치아우식증에 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

*S. mutans*가 치아의 표면위에서 성장하여 층을 형성하고, 그들 스스로 polysaccharide나 glycoprotein을 분비하여 형성된 biofilm은 구강 내에서 전형적인 형태는 치면세균막으로써 구강 질환인 치아우식증과 치주질환을 일으킨다^{4,5,26)}. 본 연구에서 biofilm형성을 백질려가 억제하는지 실험을 해본 결과 백질려 에탄올 추출물을 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도로 첨가한 군은 대조군에 비해 각각 88.2%, 53.7%, 45.7%, 35.2%, 29.7%, 23.4%의 생성율을 보였다. 즉, 실험군은 대조군과 비교해 보았을 때 각각의 농도에서 11.8%, 46.3%, 54.3%, 64.8%, 70.3%, 76.6%의 biofilm형성 억제율을 보였다. 백질려 에탄올 추출물의 biofilm 형성 억제 효과는 농도 의존적으로 유의한 차이를 보였다.

*S. mutans*는 타액성 획득피막 성분인 당단백질에 부착하는 대표적인 세균 중 하나로 GTFase를 생성하여 글루칸을 합성한다. 합성된 글루칸은 점착성이 있어 세균이 치아 평활면에 잘 부착되게 하고 각종 세균들을 응집시킨다. 부착한 세균이 증식하면 치은염과 치아면의 소와 열구를 따라 치면세균막을 형성하여 치아우식증 및 치주질환을 발생시킨다²⁷⁾. 각 농도별 백질려 에탄올 추출물이 치아표면의 세균부착을 억제하는지 알아보기 위해 S-HA에 대한 부착억제 효과를 확인한 결과 대조군에서는 400 ± 66 ($\times 10^3$) CFU/ml이 부착한 반면, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml의 각 농도에서는 380 ± 18 ($\times 10^3$) CFU/ml, 100 ± 4 ($\times 10^3$) CFU/ml, 70 ± 4 ($\times 10^3$) CFU/ml, 67 ± 3 ($\times 10^3$) CFU/ml, 66 ± 3 ($\times 10^3$) CFU/ml, 65 ± 3 ($\times 10^3$) CFU/ml의 부착을 보여, 대조군에 비해 각각 5.0%, 75.0%, 82.5%, 83.3%, 83.5%, 83.8%의 부착 억제율을 보였다. *S. mutans*는 sucrose로부터 글루칸을 합성할 수 있도록 glucosyltransferase (GTFase) 효소를 분비한다. 이렇게 합성된 글루칸은 점착성이 있어 세균이 치아표면에 잘 부착하게 하고 부착한 세균이 증식하여 치면세균막을 형성하여 치아우식증을 유발시킨다²⁸⁾. 본 연구에서는 GTFase에 의한 불용성 글루칸 형성을 백질려가 억제하는지 실험해 본 결과 백질려 에탄올 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도로 첨가한 군은 대조군에 비해 각각 $100\pm5.65\%$, $90\pm5.17\%$, $84\pm4.70\%$,

$67\pm4.39\%$, $65\pm3.18\%$, $62\pm3.18\%$, $60\pm3.17\%$ 의 생성율을 보였다. 즉, 실험군은 대조군과 비교해 봤을 때 각각의 농도에서 10.0%, 16.0%, 33.0%, 35.0%, 38.0%, 40.0%의 비수용성 글루칸 합성 억제율을 보였다.

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, 백질려 에탄올 추출물은 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, biofilm 형성 억제, S-HA에 대한 부착 억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있으므로, 항치아우식 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

결 론

치아우식 예방제를 개발하기 위해 천연물인 백질려를 에탄올로 추출하여 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, biofilm 형성 억제, S-HA에 대한 부착 억제, 비수용성 글루칸 합성 억제를 측정하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

*S. mutans*의 성장억제율이 백질려 추출물은 넣지 않은 대조군에 비해 에탄올 추출물은 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도에서 대조군에 비하여 각각 11.2%, 11.7%, 28.9%, 51.4%, 57.8%, 63.9%의 성장억제효과를 보였다($p<0.05$). *S. mutans*의 산 생성량은 대조군에서 pH는 5.47 ± 0.04 이었고, 백질려 에탄올 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 실험군에서, 각각 5.27 ± 0.10 , 5.33 ± 0.04 , 5.43 ± 0.04 , 5.47 ± 0.08 , 7.23 ± 0.04 , 7.30 ± 0.07 로 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 높아졌으며 ($p<0.05$), 특히 0.3 mg/ml 농도이상에서는 치아 우식증에서 무기질 재광화가 일어나는 임계 pH 5.5 이상을 나타냈다. Biofilm형성 억제 실험을 한 결과 대조군에 비해 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도에서 각각 88.2%, 53.7%, 45.7%, 35.2%, 29.7%, 23.4%의 생성률을 보여 0.05 mg/ml농도에서 농도 의존적으로 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$). 즉, 각각의 농도에서 11.8%, 46.3%, 54.3%, 64.8%, 70.3%, 76.6%의 biofilm형성 억제율을 보였다. S-HA에 *S. mutans* 부착율이 백질려의 에탄올 추출물 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도에서 대조군에 비해 각각 5.0%, 75.0%, 82.5%, 83.3%, 83.5%, 83.8%의 부착억제율을 보이며 통계적으로 대조군과 유의적 차이를 보이며 농도 의존적으로 높아졌다 ($p<0.05$). GTFase에 의한 비수용성 글루칸 정량 실험을 한 결과 대조군에 비해 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도에서 각각 $100\pm5.65\%$, $90\pm5.17\%$, $84\pm4.70\%$, $67\pm4.39\%$, $65\pm3.18\%$, $62\pm3.18\%$, $60\pm3.17\%$ 로 나타났으며 즉, 각각의 농도에서 10.0%, 16.0%, 33.0%, 35.0%, 38.0%, 40.0%의 비수용성 글루칸 합성 억제율을 보였다($p<0.05$).

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, 백질려 에탄올 추출물은 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, biofilm 형성 억제, S-HA에 대한 부착억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있으므로, 항치아우식 효과를 기대할 수 있을 것으로 보이며, 향후에 어떤 구성성분이 각각의 효과를 나타내는지에 대해서 순수정제 과정을 거쳐 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

- Asikaine, S., Alauusua, S. Bacteriology of dental infections. Eur Hear J 14: 430-450, 1993.
- 정선일, 이현옥, 김강주. 구강면역학. 대학사, pp 216-231, 1998.
- 김영권, 한만덕. 구강미생물학. 고문사, 261-262, 1998.
- Bortolaia, C., Sbordone, L. Biofilms of the oral cavity. Formation, development and involvement in the onset of diseases related to bacterial plaque increase. Minerva Stomatol 51: 187-192, 2002.
- Shimotoyodome, A., Kobayashi, H., Tokimitsu, I., Hase, T., Inoue, T., Matsukubot, T., Takaesu, Y. Saliva-promoted adhesion of *Streptococcus mutans* MT8148 associates with dental plaque and caries experience. Caries Res 41: 212-218, 2007.
- Wenham, D.G., Davies, R.M., Cole, J.A. Insoluble glucan synthesis by mutansucrase as determinant of the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 127: 407-415, 1981.
- Inuiue, M., Koga, T., Sato, S., Hamada, S. Synthesis adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glucosyltransferase components of *Streptococcus mutans*. FEBS Lett 143: 101-104, 1982.
- Koga, T., Hamada, S., Murakawa, S., Endo, A. Effect of a glucosyltransferase inhibitor on glucan synthesis and cellular adherence of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 38: 882-885, 1982.
- Boyd, R.L., Murray, O., Robertson, P.B. Effect of rotary electric toothbrush versus manual toothbrush on periodontal status during orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofac Orthop 96: 342-347, 1989.
- 이현, 신승철. NaF, CPC 및 UDCA를 함유한 구강양치액의 치면세균막 제거효과 및 치은염 완화 효과 평가에 관한 임상적 실험연구. 대한구강보건학회지 22: 121-133, 1998.
- 양수정, 문혁수, 김종배. 잇솔질 및 혀솔질의 구취감소효과에 관한 연구. 대한구강보건학회지 17: 268-277, 1993.
- Tsuneno, N., Masa, T., Masao, H. Dental caries prevention by traditional chinese medicines. Plant Med 44: 100-106, 1982.
- Svanberg M, Rolla G. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva after mouthrinising with SnF₂. Scand J Dent Res 90, 292-298, 1982.
- Svanberg, M., Westergren, G. Effect of SnF₂ administered as mouthrinse or topically applied on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and lactobacilli in dental plaque and

- saliva. Scand J Dent Res 9: 123-129, 1983.
15. Zimmer, S., Barthel, C.R., Koehler, C., Roulet, J.F. Enamel fluoride retention after application of fluoride-containing rubber cups. Am J Det 15: 11-14, 2002.
16. 황충주, 임선아. NaF 0.05% 양치액 사용시 고정성 교정장치 정착 환자에서의 *Streptococcus mutans*변화에 관한 연구. 대치교정치 27: 539-548, 1997.
17. Gwinnett, A.J., Ceen, R.F. Plaque distribution on bonded brackets, a scanning microscope study. Am J Ortho 75: 667-677, 1979.
18. Wilson, T.G., Gregory, R.L. Clinical effectiveness of fluoride-releasing elastomers. I, Salivary *Streptococcus mutans* numbers. Am J Orthod Dentofacial Orthop 107: 293-297, 1995.
19. 손은수. 한약재를 이용한 기능성식품의 개발동향. 한국과학기술정보연구원 기술동향분석보고서, 2003.
20. 생약학연구회. 현대 생약학. 학창사, 1988.
21. 한대석, 김영중, 김종원, 김창민, 도상학, 배기환, 성충기, 신승원, 유경수, 류승조, 육창수, 이경순, 이숙연, 이정규, 임종필, 정보섭. 생약학. 동명사, 1988.
22. 박원재, 이형재, 양승각. 상백피의 Sanggenon C에 의한 *Streptococcus mutans*의 생육 및 균부착 저해 효과. 약학회지 34: 434-439, 1990.
23. Silness J., Le, H. Periodontal disease in pregnancy. Acta Odontologica Scan 22: 121-126, 1964.
24. 김선호. 해외 건강 기능성 소재 - 백질려. <http://www.thinkfood.co.kr>, 2004.
25. O'Toole, G.A., Kolter, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 28: 449-461, 2004.
26. Socransky, S.S., Haffajee, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J periodontol. 63: 322-331, 1992.
27. 김해선, 권호근, 최충호, 김백일. 자일리톨이 함유된 Curcuma xanthorrhiza 추출물이 *Streptococcus mutans* 바이오필름에 미치는 효과. 대한구강보건학회지 30: 497-505, 2006.
28. Leitao, D.P., Filho, A.A., Polizello, A.C., Bastos, J.K., Spadaro, A.C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and Baccharis dracunculifolia extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. Biol Pharm Bull 27: 1834-1839, 2004.