

## 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성에 관한 연구

윤용일<sup>#</sup>, 이해수, 정민지, 유승일, 송용선, 권동렬<sup>\*</sup>

원광대학교 한방재활의학교실, 원광대학교 약학대학 한약학과

### Antimicrobial Effects of Ethanol Extract of *Yongdamgosam-hwan* against *Streptococcus mutans*

Yong-Il Yun<sup>#</sup>, Hae-Soo Lee, Min-Ji Jung, Seong-Il You, Yung-Sun Song, Dong-Yeul Kwon<sup>\*</sup>

Department of Korean medicine Rehabilitation Oriental Pharmacy, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University.

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Yongdamgosam-hwan*(YGH) has been used as a traditional medicine from old times for anti-inflammatory effects. *Streptococcus mutans*(*S. mutans*) is known as a prime bacteria responsible for causing caries by forming a biofilm referred to as dental plaque on the tooth surface. But antimicrobial activity of YGH with dental disease is not sufficiently understood. This study was designed to investigate the effects of YGH ethanol extract on antimicrobial effect against *Streptococcus mutans*.

**Methods** : The antimicrobial effect of YGH ethanol extract was assessed by the paper disk diffusion method and optical density method to determine minimum inhibition concentration(MIC), also observed by fractional inhibitory concentration index(FICI) and time-kill assay to figure out the synergic effect on the combination of YGH ethanol extract with antibiotics.

**Results** : The YGH ethanol extract 500 µg was 7.5-8.5 mm diameter of clear zone of inhibition against *Streptococcus mutans* in a concentration-dependent manner and MIC was 250 µg/mL. The administration of the ethanol extract in combination with gentamicin and streptomycin induced a reduction of ≥4-8-fold in all tested bacteria. Furthermore, time-kill study was found that a combination of YGH ethanol extract with oxacillin and streptomycin produced a more rapid decrease in the concentration of bacteria CFU/mL than the YGH ethanol extract or antibiotics alone.

**Conclusions** : As a result, the YGH ethanol extract has good antimicrobial effects. And the results suggest that YGH could be employed as a natural antibacterial agent in dental care products.

**Key words** : *Yongdamgosam-hwan*, *Streptococcus mutans*, antimicrobial activity, antibacterial agent, dental care product

#### 서론

龍膽苦參丸은 《雞兩源流犀燭》 16권에 수록되어 있으며, 龍膽草 37.5 g(一兩)과 苦參 112.5 g(三兩)으로 구성되어 있고, '黃疽, 黧疽, 用龍膽苦參丸', '龍膽苦參丸 黧疽勞疸'라 하여

黃疽, 黧疽과 勞疸로 아픈 것을 치료할 때 쓰이는 방제로 기록되어 있다<sup>1)</sup>.

치아우식증(dental caries)은 구강질환의 가장 대표적인 질환으로 치태 내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의해 유발되는 다인성 질환이며, 치아파괴를 동반한 감염성 질환이다<sup>2,3)</sup>.

\*Corresponding author : Dong-Yeul Kwon, Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Yong-Il Yun, Department of Oriental Medicine, Graduate School of Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-1070 · E-mail : papillon87@naver.com

· Received : 27 August 2015 · Revised : 18 September 2015 · Accepted : 22 September 2015

치아우식증을 유발하는 원인균으로 *Streptococcus mutans* 와 *Streptococcus sobrinus* 등과 같은 *oral streptococci*가 보고되었다<sup>4,5)</sup>. 그 중 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)는 치아우식증을 유발하는 대표적인 그람 양성 통성 혐기성 세균으로, 음식물에 포함된 탄수화물, 특히 포도당, 과당 등을 분해하고 그 대사과정에서 부산물로 유기산이 발생하는데, 주로 젖산을 세균 밖으로 방출하여 치아우식증이 발생한다고 보고되어 있다<sup>6,7)</sup>. 최근 현대인들의 식생활 형태가 점차 다양해짐에 따라 당류의 소비는 계속 증가하고 있고 stress 등의 원인으로 면역기능은 점점 약화되기 때문에 구강 내 미생물들이 증가 추세에 있다<sup>8)</sup>.

치아우식증을 비롯한 구강질환을 치료하기 위해 보통 penicillin, streptomycin과 같은 항생제를 사용하여 구강미생물의 성장을 억제하고 있지만, 항생제는 장기간 사용 시 내성 등의 부작용이 발생하므로 문제가 되고 있다<sup>9)</sup>. 그 외에도 치아우식증 예방의 방법으로 불소혼입 치약 사용 등을 제시하고 있으나 아직까지 충분한 효과를 거두고 있지 않다. 이러한 까닭에 보다 안전성 있고 효과적인 구강질환 치료 및 예방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 국내에서는 부작용을 극복하면서 치료효과를 개선할 수 있는 방법의 일환으로 한방 처방으로부터 치아우식증 예방물질을 개발하고자 하는 노력을 시도하고 있다. 특히 전통 처방은 예로부터 사용되어 온 한약의 혼합물로서 기존 치료제에 의한 부작용과 내성 문제를 극복할 수 있을 것으로 기대한다. *S. mutans*의 성장을 억제하는 한약재로 苦參<sup>4)</sup>, 黃柏, 黃連, 五味子<sup>9)</sup>, 烏梅<sup>10)</sup>, 龍膽草<sup>11)</sup> 등이 보고되고 있으나, 龍膽苦參丸에 대한 효능은 아직까지 연구된 바가 없다.

그러므로 본 연구는 치아우식증의 원인균으로 알려진 *Streptococcus mutans*에 대해 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 항균효과를 확인하고 항생제와의 병용효과를 측정하여 치아우식증을 예방하는 한약처방의 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 생약

본 실험에 사용한 龍膽苦參丸은 《雜病源流犀燭》<sup>1)</sup>에 있는 처방을 기준으로 하였으며, 사용된 약재인 龍膽草와 苦參은 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하여 원광대학교 한약학과 본 초학교실 권동렬 교수가 감정하여 사용하였고, 보존(Voucher No. 2014-33)하고 있다.

#### 2) 항생제 및 시약

실험에 사용한 시약은 ampicillin sodium salt & oxacillin sodium salt monohydrate & gentamicin sulfate & streptomycin sulfate salt(SIGMA), brain heart infusion (BHI, Difco, USA), dimethyl sulfoxide(DMSO), MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5mg/mL]는 시그마케미칼사(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 3) 실험균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주 *Streptococcus mutans*(KCOM 1054, KCOM 1202)는 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM, 한국)에서 분양 받아 사용하였고, 각각의 균주들은 -70℃ deep freezer에서 15% glycerol에 보관하고, Brain Heart Infusion Agar(BHI, Difco, USA)에 접종하여 37℃ incubator에서 24시간 배양 후 0.5 McFarland 표준 탁도( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL)로 실험에 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 추출물의 제조

龍膽苦參丸 에탄올 추출물은 龍膽草 4g과 苦參 12g을 70% 에탄올 500mL로 2시간씩 3회에 달여 추출하였으며, 감압 농축한 후 동결 건조하여(yield 4.75%) 4℃에서 보관하였다. 시약은 멸균증류수에 녹여 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. The Composition of *Yongdamgosam-hwan*(龍膽苦參丸)

Herbal Name	Pharmacognostic name	Weight(g)	Yield(%)
龍膽草	Gentianae scabrae Radix	4	4.75
苦參	Sophorae Radix	12	

### 2) 항균효과 측정(Disc diffusion method)

항균효과는 디스크 확산법(Disc diffusion method)에 의해 측정하였다<sup>12-13)</sup>. brain heart infusion agar(BHI)를 고압 멸균하여 petri-dish에 균한 다음, 균 100μL를 골고루 도말하였다. 모든 균주는 37℃ incubator에서 24시간 배양하였으며,  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL을 희석하여 BHI에 최종적으로  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL가 되게 하였다. 다음으로 멸균된 paper disc(6 mm)에 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 500, 1000, 2000 μg과 ampicillin, oxacillin, gentamicin, streptomycin 250 μg을 완전히 흡수시킨 후 37℃ incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc의 직경을 포함한 주위에 형성된 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

### 3) 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

Minimum inhibitory concentration(MIC)는 배지 미량 희석법을 통해 측정하였다<sup>14-15)</sup>. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 상용 항생제인 ampicillin, oxacillin, gentamicin, streptomycin을 BHI 액체배지에 농도별로 첨가하고, 여기에 탁도를  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL로 맞춘 균을 10 μL 접종하여 최종적으로  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL이 되게 하였다. 다음으로 37℃ incubator에서 18시간 배양한 후 육안으로 관찰하였을 때 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 농도를 MIC로 측정하였다<sup>16)</sup>.

### 4) 약물병용효과(Fractional inhibitory concentration index, FICI)

Checkerboard dilution test<sup>17)</sup>를 이용하여 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 상용 항생제인 ampicillin, oxacillin, gentamicin, streptomycin을 병행처리 하였을 때 항생제 효능의 변화를

통해 최소억제농도(minimum inhibitory concentrations)를 측정하였다<sup>18)</sup>. 두 항균물질은 BHI를 보충하여 순차적으로 희석하였다. 접종원은 37°C incubator에서 24시간 배양한 후에 사용하였으며, 최종적으로 1.5 × 10<sup>6</sup> CFU/mL가 되게 하였다. FICI값은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Fractional inhibitory concentration index(FICI)} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = [\text{A}]/\text{MIC}_A + [\text{B}]/\text{MIC}_B$$

이때 [A]는 병용한 A약물의 농도이며, MIC<sub>A</sub>는 A약물의 MIC이다. FICI는 0.5미만은 synergy, 0.5에서 0.75까지는 partial synergy, 0.76부터 1.0미만은 additive effect, 1.0이상 4.0미만은 indifference, 그리고 4.0이상은 antagonism을 따른다<sup>19)</sup>. 따라서 이들의 범위에 따라 두 항균물질의 다양한 synergy 비율을 측정하였다.

5) Time-kill assay

Time-kill curve assay는 항균물질의 농도에 따른 박테리아의 성장을 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 별로 그래프를 나타내었다<sup>20)</sup>. 항균물질로 龍膽苦參丸 에탄올 추출물, 항생제를 단독으로 사용하였을 때, 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 항생제를 병용하였을 때의 균수를 측정하였다. 박테리아는 24시간 배양된 균을 사용하였으며, 1.5 × 10<sup>6</sup> CFU/mL을 기준으로 하여 BHI에 100배씩 순차적으로 희석하여 10μL씩 도말하였다. control로써는 BHI에 균만을 배양하였다. Colony counts는 37°C incubator에서 24시간의 간격을 두고 colonies를 측정하였다.

6) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복하였고, 실험결과는 Microsoft office excel 2010을 이용하여 studen's t-test 분석법을 적용하였으며 그 값은 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 신뢰수준 95%(p < 0.05)에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 디스크 확산법(Disc diffusion method)

*S. mutans*(KCOM 1054, KCOM 1202)에 대한 항균활성 측정결과는 Table 2와 같다. *S. mutans*(KCOM 1054)에서는 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 500 μg에서 지름이 7.5 mm, *S. mutans*(KCOM 1202)에서는 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 500 μg에서 지름이 8.5 mm인 clear zone이 나왔으며, 모두 농도 의존적으로 증가하였고 250μg의 항생제의 항균 능력보다 낮은 결과를 확인하였다(Table 2).

Table 2. Antimicrobial Activities of YGH\* Ethanol Extract against *S. mutans* Strains

<i>S. mutans</i> strain	Diameter of zone of inhibition(mm)						
	YGH			AM*	OX*	GT*	ST*
	250 μg	500 μg	1,000 μg	250 μg	250 μg	250 μg	250 μg
KCOM 1054	ND	7.5	11	32	22	23	7
KCOM 1202	ND	8.5	10	23	26	ND	9

\*YGH : *Yongdamgosam-hwan* \*AM : ampicillin \*OX : oxacillin \*GT : gentamicin \*ST : streptomycin \*ND : No detected activity at this concentration

2. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

*S. mutans*(KCOM 1054, KCOM 1202)에 대한 龍膽苦參丸의 에탄올 추출물과, ampicillin, oxacillin, gentamicin, streptomycin의 MIC를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 MIC는 두 개의 *S. mutans* (KCOM 1054, KCOM 1202)에서 모두 250 μg/mL이었으며 항생제의 MIC 보다는 높은 결과를 확인하였다(Table 3).

Table 3. MIC of YGH\* Ethanol Extract against 2 Strains of *S. mutans*

<i>S. mutans</i> strain	MIC(μg/mL)				
	YGH	AM*	OX*	GT*	ST*
KCOM 1054	250	31,25	125	31,25	250
KCOM 1202	250	ND	ND	31,25	125

\*YGH : *Yongdamgosam-hwan* \*AM : ampicillin \*OX : oxacillin \*GT : gentamicin \*ST : streptomycin \*ND : No detected activity at this concentration

3. 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

1) 항생제 ampicillin과 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 병용효과 측정결과

龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 ampicillin과의 병용효과를 본 결과는 Table 4와 같다. *S. mutans*(KCOM 1054)에 대해 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 ampicillin을 동시에 투여 하였을 때 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 MIC는 감소하지 않았고 ampicillin은 오히려 MIC 값이 증가했다. 따라서 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 ampicillin은 indifference의 효과를 확인하였다(Table 4).

Table 4. MIC of YGH\* Combination with Ampicillin against *S. mutans*

<i>S. mutans</i> strain	MIC(μg/mL) of YGH		MIC(μg/mL) of AM*		FICI	Synergy
	Alone	With AM	Alone	With YGH		
KCOM 1054	250	250	31,25	62,5	3,0	indifference

\*YGH : *Yongdamgosam-hwan* \*AM : ampicillin

2) 항생제 oxacillin과 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 병용효과 측정결과

龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 oxacillin과의 병용효과를 본 결과는 Table 5와 같다. *S. mutans*(KCOM 1054)에서 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 oxacillin의 MIC는 서로 병용하였을 때 변화하지 않았으므로 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 oxacillin은 서로 병용효과가 없음을 확인하였다(Table 5).

Table 5. MIC of YGH\* Combination with Oxacillin against *S. mutans*

<i>S. mutans</i> strain	MIC(μg/mL) of YGH		MIC(μg/mL) of OX*		FICI	Synergy
	Alone	With OX	Alone	With YGH		
KCOM 1054	250	250	125	125	2,0	indifference

\*YGH : *Yongdamgosam-hwan* \*OX : oxacillin

3) 항생제 gentamicin과 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 병용효과 측정결과

龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 gentamicin과의 병용효과를 본 결과는 Table 6과 같다. *S. mutans*(KCOM 1054)에서는 龍膽苦參丸 에탄올 추출물은 1/4 MIC로 줄었으며, gentamicin은 1/8 MIC로 저해농도가 감소하여 synergy 효과를 보였다. *S. mutans* (KCOM 1202)에서는 龍膽苦參丸은 1/4 MIC, gentamicin은 1/16로 저해농도가 크게 줄어 synergy 효과를 나타냄을 확인하였다(Table 6).

Table 6. MIC of YGH\* Combination with Gentamacin against *S. mutans*

<i>S. mutans</i> strain	MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) of YGH		MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) of GT*		FICI	Synergy
	Alone	With GT	Alone	With YGH		
KCOM 1054	250	62,5	31,25	3,9	0,375	synergy
KCOM 1202	250	62,5	31,25	1,95	0,313	synergy

\*YGH : *Yongdamgosam-hwan* \*GT : gentamicin

4) 항생제 streptomycin과 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 병용효과 측정결과

龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 streptomycin과의 병용효과를 본 결과는 Table 7과 같다. *S. mutans*(KCOM 1054)에서는 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 streptomycin은 1/4 MIC로 낮아졌으며 *S. mutans*(KCOM 1202)에서는 각각 1/4 MIC, 1/8 MIC의 농도 감소 효과를 보였으므로 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 streptomycin의 synergy 효과를 확인하였다(Table 7).

Table 7. MIC of YGH\* Combination with Streptomycin against *S. mutans*

<i>S. mutans</i> strain	MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) of YGH		MIC( $\mu\text{g/mL}$ ) of ST*		FICI	Synergy
	Alone	With ST	Alone	With YGH		
KCOM 1054	250	62,5	250	62,5	0,5	synergy
KCOM 1202	250	62,5	125	15,6	0,375	synergy

\*YGH : *Yongdamgosam-hwan* \*ST : streptomycin

4. The Time-kill assay

1) 표준균주 *S. mutans*(KCOM 1054)에 대한 성장곡선 측정결과

*S. mutans*(KCOM 1054)에 대한 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 시간에 따른 항균활성을 측정하여 균의 성장정도를 나타낸 그래프는 Figure 1과 같다. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 1/4 MIC를 *S. mutans*(KCOM 1054)에 적용하였을 때 대조군에 비해 균이 억제되었으며, gentamicin 1/8 MIC를 *S. mutans*(KCOM 1054)에 적용하였을 때 균이 억제되었고, 둘을 병용하였을 때에는 24시간째에 균이 완전히 억제되었다(Fig. 1).

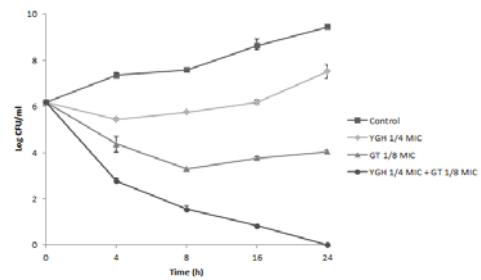


Fig. 1. Time-kill curves of *S. mutans*(KCOM 1054) using 62.5  $\mu\text{g/mL}$  YGH\* with 3.9  $\mu\text{g/mL}$  GT\*. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24h. The data are average of triple-independent experiments. YGH : *Yongdamgosam-hwan* ethanol extract GT : gentamicin

2) 표준균주 *S. mutans*(KCOM 1054)에 대한 성장곡선 측정결과

*S. mutans*(KCOM 1054)에 대한 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 시간에 따른 항균활성을 측정하여 균의 성장정도를 나타낸 그래프는 Figure 2와 같다. *S. mutans*(KCOM 1054)에 대해서 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 1/4 MIC를 적용하였을 때 대조군에 비해 균이 억제되었고, streptomycin 1/4 MIC를 적용하였을 때에 시간 경과에 따라 균이 억제되었으며, 둘을 함께 병용하였을 때에는 균에 대한 억제력이 더욱 커져 균이 현저히 감소됨을 확인하였다(Fig. 2).

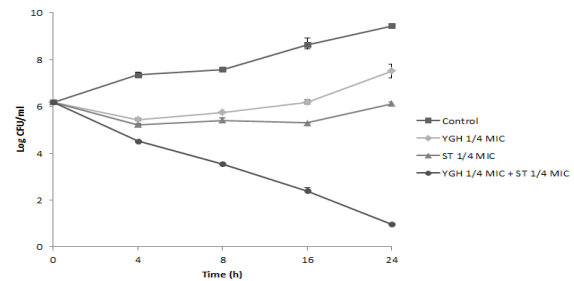


Fig. 2. Time-kill curves of *S. mutans*(KCOM 1054) using 62.5  $\mu\text{g/mL}$  YGH\* with 62.5  $\mu\text{g/mL}$  ST\*. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24h. The data are average of triple-independent experiments. YGH : *Yongdamgosam-hwan* ethanol extract \*ST : streptomycin

3) 표준균주 *S. mutans*(KCOM 1202)에 대한 성장곡선 측정결과

*S. mutans*(KCOM 1202)에 대한 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 시간에 따른 항균활성을 측정하여 균의 성장정도를 나타낸 그래프는 Figure 3과 같다. 표준균주에 대하여 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 1/4 MIC와 gentamicin 1/16 MIC를 단독 사용하였을 때 둘 모두 대조군에 비해 균을 억제하였고, 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 gentamicin을 병용하였을 때에는 각각을 단독으로 사용하였을 때보다 억제력이 현저하게 증가되었다(Fig. 3).

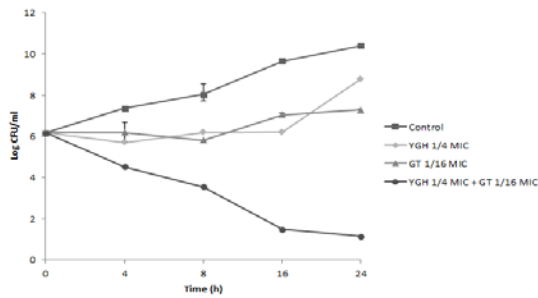


Fig. 3. Time-kill curves of *S. mutans*(KCOM 1202) using 62.5 µg/mL YGH\* with 1.95 µg/mL GT. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24h. The data are average of triple-independent experiments. YGH : *Yongdamgosam-hwan* ethanol extract GT : gentamicin

#### 4) 표준균주 *S. mutans*(KCOM 1202)에 대한 생장곡선 측정결과

*S. mutans*(KCOM 1202)에 대한 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 시간에 따른 항균활성을 측정하여 균의 생장정도를 나타낸 그래프는 Figure 4와 같다. 표준균주에 대하여 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 1/4 MIC와 streptomycin 1/8 MIC를 단독으로 사용하였을 때 대조군에 비해 균이 억제되었고, 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 streptomycin을 병용 사용하였을 때는 균이 더 많이 억제됨을 확인하였다(Fig. 4).

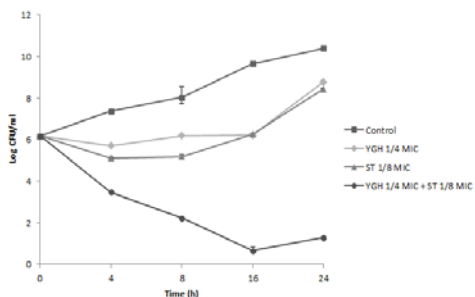


Fig. 4. Time-kill curves of *S. mutans*(KCOM 1202) using 62.5 µg/mL YGH† with 15.6 µg/mL ST. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24h. The data are average of triple-independent experiments. YGH : *Yongdamgosam-hwan* ethanol extract ST : streptomycin

## 고찰

현대인의 질병 중 구강질환은 예전부터 존재했던 고질적 질병이자 최근까지도 여전히 이슈가 되고 있는 병이다. 또한 식생활의 변화로 당질이 다량 함유된 가공식품의 섭취가 증가하면서 해마다 그 발생빈도가 증가하는 추세에 있기 때문에 구강질환에 대한 예방 및 치료에 대한 연구가 활발해지고 있다.

구강 관련 질환으로는 치아우식증, 치주질환, 치수 및 치근단 질환과 구강 및 악골에 발생하는 골수염 등이 있으며 대부분이 구강 내 서식하는 세균에 의한 기회감염의 결과로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 구강 내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*는 치면(齒面, surface of tooth)에 부착, 증식 및 산 생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발하며, 구강 내의 다른 세균보다 당으로부터 산을 생성 하는 능력과 다당류를 저장하는 능력이 뛰

어나다<sup>3,24)</sup>. 그러므로 구강질환을 예방하기 위해서는 세균의 성장을 억제하거나 획득피막에 세균이 부착되는 것을 억제할 수 있는 항 미생물 제제가 요구된다<sup>23,24)</sup>. 대표적으로 penicillin과 같은 항생제를 사용하지만 지속적인 항생제 투여 시 미생물은 항생제에 대해 내성을 가지며 진화하기 때문에 더 강한 항생제의 개발은 더 강한 균을 만드는 결과를 초래할 수 있다. 그렇기 때문에 많은 연구자들은 인체에 부작용이 없는 것으로 알려진 천연물 중에서 항균작용을 보이는 물질을 이용한 의약품 개발에 대한 연구에 관심을 보이고 있다.

본 실험에서는 苦參과 龍膽草로 구성된 龍膽苦參丸의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균 활성에 관한 연구를 진행하였다.

苦參은 청열약으로 성질이 차고 매우 쓴맛을 지니고 있으며, 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利尿의 효능이 있어, 濕熱黃疸, 瀉痢, 赤白帶下, 陰痒, 皮膚瘙癢, 濕疹農膿疱瘡, 小便不利, 灼熱澀通 등을 치료하는 것으로 알려져 있다. 항병원체 작용, 항알러지 작용, 항부정맥작용 등의 약리작용을 가지고 있다고 알려져 있다<sup>21)</sup>. 苦參의 성분으로는 alkaloid, flavonoid saponin 등이 알려져 있으며, flavonoid 화합물인 kuwanon C는 5-lipoxygenase와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 저해제로 항염작용이 보고되었고, sophoraflavanone G는 항균 및 항산화작용이 알려졌으며 kurarinone도 항균활성이 보고되었다<sup>27,29-32)</sup>. 또한, 苦參에서 분리된 alkaloid 화합물인 matrine과 oxymatrine은 세포자멸사를 유도하거나 암세포 성장을 저해함으로써 항암작용을 가짐이 보고되었으며<sup>27,33,34)</sup>, 이질균, 대장균, 변형균, β-연쇄상구균 및 황색포도상구균과 같은 균에 대해 비교적 뚜렷한 억제작용을 한다<sup>25)</sup>.

龍膽草는 청열약으로 성질이 차고 쓴맛을 지니며 淸熱燥濕, 瀉肝定驚의 효능이 있어, 濕熱의 黃疸, 陰腫陰痒, 帶下, 濕疹, 고열의 驚厥, 肝火로 인한 脇痛, 頭痛, 目赤, 耳聾 등의 증상을 치료하는 것으로 알려져 있으며, 이뇨작용, 소염작용, 녹농균, 변형균, 티푸스균, 황색포도상구균 및 일부 진균 억제 작용 등의 약리작용을 가지고 있다<sup>26)</sup>.

한방에서 피부소양, 급성 전염성 감염 및 세균성이질 치료제로 사용되어져 온 苦參은 항암, 항염증<sup>35)</sup>에 대한 연구는 물론, 다양한 균에 대한 항균 활성 능력을 이미 입증한 바 있다. 특히 *Streptococcus mutans*의 경우 苦參의 추출용매에 대한 항균 활성 연구에서 물이나 메탄올보다 에탄올 추출물에 의한 항균효과가 더 우수한 효과가 나타난 것을 확인했다. 이것은 한방에서 환(丸)을 복용할 때 열수 또는 술과 함께 복용하는 이유를 설명하는 간접적인 결과로 사료된다<sup>27,28)</sup>.

본 실험에서는 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 *S. mutans* 균주에 대한 항균 효과를 확인하였다. Disc diffusion method를 통하여 항균활성을 측정한 결과 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 500 µg은 두 개의 *S. mutans*에 대해 7.5-8.5 mm의 clear zone을, 1000 µg은 7.5-8.5 mm의 clear zone을 보였으며, 배지 미량 희석법을 통해 龍膽苦參丸 에탄올 추출물의 MIC를 알아본 결과 두 개의 *S. mutans*에서 모두 250 µg/mL 이었다. 또한 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 gentamicin과 streptomycin을 병용하였을 때 모든 균에 대하여 4-8배의 MIC 감소를 보였다. 그리고 time-kill assay를 통해, 龍膽苦參丸 에탄올 추출물과 gentamicin, streptomycin을 병용하였을 때 龍膽

苦參丸 에탄올 추출물이나 항생제를 단독 사용하였을 때보다 더 빠른 균의 감소가 있음을 확인하였다.

이를 통해 龍膽苦參丸은 그 자체로 *S. mutans*에 대한 항균효과가 있으며 항생제와 병용하여 사용할 경우 龍膽苦參丸과 항생제 모두 기존 MIC보다 적은 MIC에서도 항균효과가 있음을 알 수 있었다.

이러한 결과는 구강질환의 치료제로써 龍膽苦參丸의 이용 가능성을 열어주었다. 또한 실험은 龍膽苦參丸이 항생제와 병용하여 실험한 결과에서 기존 항생제의 사용을 현저히 감량할 수 있음을 시사한다. 따라서 항생제의 과잉사용으로 인한 부작용과 균이 가질 수 있는 내성을 해결하는 하나의 방안이 될 수 있으리라 생각된다.

## 결론

이번 연구를 통해서 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물은 *S. mutans*에 대한 MIC (최소억제농도)가 250  $\mu\text{g}$ 이었다.
2. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물은 disc diffusion method로 본 clear zone에서 500~1,000  $\mu\text{g}$ 에서 항균 효과가 나타났다.
3. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물은 항생제와의 약물병용 효과에서 *S. mutans*(KCOM 1054, 1202)에서 gentamicin과 streptomycin과 병용 시 synergy effect를 확인 할 수 있었다.
4. 龍膽苦參丸 에탄올 추출물, 항생제를 각각, 그리고 병용하여 시간에 따라 균의 생장을 colony counts 측정 한 결과, 龍膽苦參丸 에탄올 추출물 1/4 MIC에서 시간이 경과함에 따라 균이 감소하였으며, 특히 *S. mutans* (KCOM 1054)에 대하여 gentamicin과 병용 시 균이 24시간에서 완전히 억제되었다.

이상의 실험 결과로 보아 龍膽苦參丸 에탄올 추출물은 *Streptococcus mutans*에 대해 유효한 항균작용을 보였고, 항생제와의 병용 실험에서 synergy effect를 확인할 수 있었다. 이에 치아우식증을 예방하는 제제로서 龍膽苦參丸을 이용한 개발이 가능함을 제시하였으며 더욱 효과적인 증치 예방 및 치료제로서의 발전을 위해 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

This research was financially supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MSIP)(2008-0062484)

## References

1. Fang HI. Chinese medicine Prescription unabridged dictionary(Vol.3). 1st rev. ed. Beijing : People's Medical Publishing House. 1994 : 338-9.
2. Park SN, Lee DK, Lim YK, Kim HS, Cho EG, Jin DC, Kim SG, Kook JK. Antimicrobial Effect of Carvacrol against Cariogenic and Periodontopathic Bacteria. *Kor J Microbiology*. 2012 ; 48 : 52-6.
3. Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J Dent Res*. 1984 ; 63(3) : 407-11.
4. Lee JR, Park SJ, Kim SC. Antimicrobial Effects of Sophorae Radix Extracts against Oral Microorganisms. *Kor J Herbol*. 2010 ; 25(2) : 81-8.
5. Allaker RP, Douglas CWI. Novel antimicrobial therapies for dental plaque-related disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 ; 33 : 8-13.
6. Koga T, Askawa H, Okahashi N, Hamada S. Sucrose-dependent Cell Adherence and Cariogenicity of Serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*. 1986 ; 10 : 2873-83.
7. You YS, Park KM, Kim YB. Antimicrobial activity of some medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*. 1993 ; 21 : 187-91.
8. Hwang JK, Chung JY, Beak NI, Park JH. Isopanduratin A from *Kaempferia pandurata* as an active antibacterial agent against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agent*. 2004 ; 23 : 377-81.
9. Kwak DJ. Antibacterial Activities of Phllo dendri Cortex on the *Streptococcus mutans*. *J Kor Soc Hygienic Sci*. 2004 ; 10(2) : 99-107.
10. Lee JS. Antimicrobial effect of prunus mume extract against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Chonnam National University Graduate School. 2014.
11. Kim KW, Beak JK, Jang YK, Kum EJ, Kwon YS, Kim HJ, Sohn HY. Screening of Antibacterial Agent Against *Streptococcus mutans* from Natural and Medicinal Plants. *J Life Sci*. 2005 ; 15(5) : 720.
12. Dzink JL, Socransky SS. Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 ; 27(4) : 663-5.
13. Kwon DY, Kang OH, Choi JG, Lee YS, Oh YC, Chae HS, Lee GH, Park PS, Kim YC, Sohn DH, Park H, Lee JH. Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 2007 ; 78(6) : 430-3.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2 A7. Wayne, PA : CLSI. 2000.

15. Veljic M, Tarbuk M, Marin PD, Ciric A, Sokovic M, Marin M. Antimicrobial activity of methanol extracts of mosses from Serbia. *Pharm Biol*. 2008 ; 46(12) : 871-5.
16. Shahverdi AR, Fakhimi A, Zarrini G, Dehghan G, Iranshahi M. Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalexin against *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*. 2007 ; 30(9) : 1805-7.
17. Lorian V. *Antibiotics in Laboratory medicine*. 3rded. New York : Williams and Wilkins Co. 1985 : 537-45.
18. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12202 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992 ; 72(2) : 195-8.
19. Yoon SY, Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS. Antibacterial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Arch Pharm Res*. 1994 ; 17 : 438-42.
20. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Parkand YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 ; 46 : 1302-9.
21. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. *Traditional Herbal Pharmacognosy*. 3rded. Seoul : Shinilbooks. 2005 : 99-101.
22. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001 ; 183 : 3770-83.
23. Norman PW, Rovert RW, Rosen S. *Essentila Dental Microbiology*. USA : Appleton & Lange. 1991.
24. Jeon ES, Han MD, Kim HD. Antimicrobial Activity of *Streptococcus mutans* by *Schizandrae fructus* and *Evodiae fructus* extracts. *J Hygiene Sci*. 2003 ; 3(1) : 39-44.
25. Boo YM, Kwon DY, Seo BI, Choi HY, Lee JH. *Medicinal Herbalogy*. Seoul : Younglimsa. 2012 : 229-32.
26. Boo YM, Kwon DY, Seo BI, Choi HY, Lee JH. *Medicinal Herbalogy*. Seoul : Younglimsa. 2012 : 227-9.
27. Park SJ, Kim SC, Lee JR. Antimicrobial Effects of *Sophorae Radix* Extracts against Oral Microorganisms. *Kor J Herbol*. 2010 ; 25(2) : 81-8.
28. Lee JH. Antimicrobial Activity of Medicinal Plants against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Mokwon University Graduate School. 2011.
29. Yook CS, Kim SM, Jeong JM, Jeong MS, Kim JH, Kim SB. Pharmacology, component, clinical application of Traditional medicine. Seoul : Gyechookpublisher. 1995 : 414-6.
30. Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase. *Biochem Pharmacol*. 2001 ; 62 : 1185-91.
31. Cha JC, Moon SE, Kim JY, Jung EK, Lee YS. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phy Res*. 2009 ; 23(9) : 1326-31.
32. Chen L, Cheng X, Shi W, Lu Q, Go VL, Heber D, Ma L. Inhibition of growth of *Streptococcus mutans*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and vancomycin-resistant enterococci by kurarinone, a bioactive flavonoid isolated from *Sophora flavescens*. *J Clin Microbiol*. 2005 ; 43(7) : 3574-5.
33. Ma L, Wen S, Zhan Y, He Y, Liu X, Jiang J. Anticancer effects of the Chinese medicine matrine on murine hepatocellular carcinoma cells. *Planta Medica*. 2008 ; 74(3) : 245-51.
34. Song G, Luo Q, Qin J, Wang L, Shi Y, Sun C. Effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis in human hepatoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006 ; 48(1) : 1-5.
35. Kang MH, Lee JH, Lee JH, Cho SY, Choi JS, Kim YS, Kang SS, Jeong CS. Antigastritic and Anti *Helicobacter pylori* of *Trifolirhizin* from *Sophora Radix*. *Kor J Pharmacogn*. 2006 ; 37(4) : 271-7.