

## Antimicrobial Effect of *Coptidis rhizome* Extract against Mutans Streptococci and Periodontopathogens

Soon-Nang Park, Yun Kyong Lim, and Joong-Ki Kook\*

Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea

(received May 21, 2015; revised Jun 9, 2015; accepted Jun 10, 2015)

The purpose of the study was to investigate the antimicrobial activity of the methanol extract of *Coptidis rhizome* against the type strains of cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, and the periodontopathogens, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The antimicrobial activities of the crude extract and the methanol extract fractions of *Coptidis rhizome* separated by silica gel chromatography were evaluated by determining the minimal bactericidal concentration (MBC) values, using the microdilution method. The cell viability test of the extracts of *Coptidis rhizome* on the KB cells was also studied by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Our results showed that the 11th fraction (F11) of the methanol extract had the greatest antimicrobial activity against the tested bacteria, with no associated cytotoxicity on the KB cells, upto a concentration of 50 µg/ml. These results suggest that the silica gel chromatography fraction F11 of the methanol extract of *Coptidis rhizome*, could be useful in the development of oral

hygiene products as an antimicrobial agent for the prevention of dental caries and periodontal diseases.

**Key words:** antimicrobial effect, *Coptidis rhizome*, mutans streptococci, periodontopathogens.

### 서 론

양대 구강병인 치아우식증과 치주질환은 구강 내 존재하는 세균이 주요한 원인인자인 세균감염성질환으로 잘 알려져 있다. 치아우식증은 치면세균막 내 당질대사를 통해 분비되는 이차 대사산물인 유기산들(주로 젖산)에 의해 치아 법랑질 표면이 탈회되면서 발병이 시작되며, 이들의 주요한 원인균은 뮤탄스 그룹 연쇄구균(뮤탄스 연쇄구균)인 것으로 보고되었다[1-2]. 치주질환은 치아 주변 조직인 치은, 치조골, 치주인대 및 백악질에 염증이 발생하는 질환으로 치아 소실의 주요한 원인이며 서 동맥경화증과 같은 심혈관질환뿐만 아니라 폐혈증, 유산, 조산, 폐렴 및 당뇨병과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다[3-6]. 치주질환과 관련된 세균들은 주로 치은연하치면세균막에 서식하는 그람 음성 혐기성세균들로 알려져 있다[7-8].

치아우식증 및 치주질환의 예방에 있어서 올바른 잇솔질로 이들 치면세균막을 제거하는 것이 좋은 방법이라 할 수 있다. 하지만, 잇솔질로는 치아 교합면의 와나 열구에 존재하는 세균막이나 치아 인접면에 있는 세균막까지는 제거가 어렵다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 치실이나 항균능이 부여된 구강양치용액을 사용한다.

\*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.  
Tel.: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706  
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

구강양치용액의 항균성분으로는 장기간 사용 시 항생제와 같은 내성이 없는 천연물에서 추출한 엔센셜 오일들(essential oils)이나 플라보노이드 계열의 단일 화합물을 추출하여 그 가능성을 연구하는 결과물이 보고되고 있다[9,10]. 하지만, 이러한 단일 화합물들은 추출하고 정제하는 데 많은 시간과 비용이 들기 때문에 복합추출물을 이용하려는 연구들이 진행되었다[11,12].

황련(학명; *Coptis japonica*, 라틴명; *Coptidis rhizome*)은 전통의학에서 오랫동안 염증과 관련된 질환에 사용되어 왔으며, 최근 연구 결과물들에 의하면 항균, 항말라리아 및 항당뇨 효과가 있는 것으로 보고되었다[13-17]. 하지만 황련의 치아우식증과 치주질환 원인균에 대한 연구는 미미한 실정이다. 그러므로 본 연구는 황련 메탄올 추출물의 치아우식증과 치주질환 원인균에 대한 항균능을 조사하여 향후 두 질환의 예방을 위한 치약 및 구강양치용액 등과 같은 구강위생용품 개발에 사용 가능하는지를 알아보기 위해 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 황련 메탄올 추출물

중국이 원산지인 건조된 황련을 보림한약계약(Jinju, Korea)에서 구입하여 본 연구에 사용하였다. 분쇄기를 이용하여 분말로 만든 황련 100 g을 메탄올(DA JUNG, Seoul, Korea) 500 ml과 섞은 다음 실온에서 48시간 동안 shaking incubator로 추출 하였다. 추출액은 원심분리기(5000 rpm, 20분)를 이용하여 원심분리하여 상층액을 취한 다음, 회전농축기(RV 10, IKA, Seoul, Korea; 80 rpm, 40°C)로 농축하고, 동결건조(LABCONCO, Kansas City, MO, USA)하여 황련 메탄올 추출물을 얻었다. 동결 건조된 황련 메탄올 추출물은 DMSO (Sigma)로 200 mg/ml 농도로 녹인 후 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(5415D, Eppendorf, Hamburg, Germany)하여 상층액을 취하여 다음 실험에 사용하였다.

### 실리카겔 크로마토그래피를 이용한 분획물 추출

황련 메탄올 추출물은 실리카 겔 크로마토그래피를 실시하여 분획화하였다. 메탄올 추출물 20 g을 메탄올 50 ml에 녹인 후 ethyl acetate (HPLC solvent, DA JUNG, Seoul, Korea) 50 ml을 혼합한 후 원심분리(1,500 rpm, 10 분) 하였다. 상층액에 실리카 겔(Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) 40 g과 잘 섞은 후 용매를 기화(실온에서 10시간 동안)시켜 분말 상태로 건조시켰다. 추출물-실리카 겔 분말에 n-Hexane 100 ml과 섞은 후 실리

카 겔 컬럼 충전물 위에 조심히 넣었다. 이동상 용액은 n-Hexane:ethyl acetate 비율이 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 0:10이 되도록 만든 후 순차적으로 컬럼에 흘려주었다. 각 비율의 용액을 500 ml씩 3번 분획(10:0 비율만 500 ml씩 2번 분획)하여 회전 농축기(40°C, 80 rpm)로 농축하여 동결건조시켜 다음과 같은 20개의 분획을 얻었다: 10:0- I (F1), 10:0- II (F2), 9:1- I (F3), 9:1- II (F4), 9:1- III (F5), 8:2- I (F6), 8:2- II (F7), 8:2- III (F8), 7:3- I (F9), 7:3- II (F10), 7:3- III (F11), 6:4- I (F12), 6:4- II (F13), 6:4- III (F14), 5:5- I (F15), 5:5- II (F16), 5:5- III (F17), 0:10- I (F18), 0:10- II (F19), 0:10- III (F20). 동결 건조된 각각의 실리카 겔 크로마토그래피 분획물들(F1~F20)을 DMSO (Sigma)로 20 mg/ml 농도로 녹인 후 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(5415D, Eppendorf, Hamburg, Germany)하여 상층액을 취하여 다음 실험에 사용하였다.

### 세균 및 세균배양

본 연구에 사용된 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup>, *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>, *P. gingivalis* ATCC 33277<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *T. denticola* ATCC 35405<sup>T</sup> 및 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup> 균주들은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

연쇄구균들은 Todd Hewitt (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체배지 또는 한천배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 1-2일간 배양하였다. *A. actinomycetemcomitans*는 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 75 mg/ml of bacitracin, and 5 mg/ml of vancomycin (Sigma)이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, Becton, Dickinson and Company) 배지에서 배양하였다. *T. denticola* 균주는 1494 modified NOS medium (ATCC)을 이용하여 배양하였다. *P. gingivalis* 및 *P. intermedia* 균주들은 TSB에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>이 첨가된 배지에 배양 하였다. 연쇄구균을 제외한 모든 세균들은 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

### 최소살균농도 측정

황련의 메탄올 추출물 원액과 실리카 겔 크로마토그래피에서 얻은 분획물의 뮤탄스 연쇄구균 및 그람 음성 치주질환 원인균에 대한 항균능을 알아보기 위한 최소 살균농도 값은 앞선 연구에서 기술된 액체배지를 이용

한 미세희석(micro-dilution) 방법을 약간 변형하여 측정하였다[18]. 이를 간략히 설명하자면, 각각의 세균 균주에 맞는 액체배지 및 배양 조건에서 24시간 배양하였다. 파장 595 nm에서 배양액의 흡광도를 측정한 후 세균이  $1 \times 10^4$  CFU/ml가 되도록 균주 각각의 배지로 희석하여 100  $\mu$ l씩 96 well plate에 넣었다. 실리카 겔 크로마토그래피 분획물이 20 mg/ml이 되도록 DMSO (Sigma)로 녹였다. 이들을 다시 각각의 세균 배지로 200  $\mu$ g/ml이 되도록 희석하고, 이들을 다시 2배씩 순차적으로 배지를 이용하여 희석한 다음, 앞서 96-well plate에 세균을 분주한 well에 100  $\mu$ l씩 분주하여 세균 배양액에 크로마토그래피 분획물의 농도가 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2  $\mu$ g/ml인 조건이 되도록 하여 뮤탄스 연쇄구균의 경우 24시간, 나머지 혐기성 그람 음성 세균의 경우 48시간씩 각각의 성장 조건에서 배양하였다. 위의 세균배양액에서 10  $\mu$ l를 취하여  $10^2$ 배 희석한 뒤 각각의 세균에 적절한 한천 배지에 도말하여 37°C에서 48 시간 동안 배양한 뒤 균락이 형성되지 않은 최소 농도를 최소살균농도로 결정하였다. 각 반응은 3회 반복하여 모두 일치하는 농도를 선택하였다.

#### 황련 메탄올 추출물의 세포 생존율 평가

세포 생존율 평가를 위해 KB 세포주를 이용하였으며, 이는 ATCC에서 구입하였다. KB 세포주는 Modified Eagles Medium (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (Gibco BRL)과 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL)이 혼합된 세포배양액을

을 이용하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>가 첨가되고, 100% 습도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다[18].

황련의 메탄올 추출물 원액과 항균활성을 보이는 실리카 겔 크로마토그래피 분획물의 KB 세포주에 대한 세포 생존율을 알아보기 위하여 앞선 연구에서 기술된 방법으로 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 분석법을 이용하여 측정하였다[9]. 이때 사용된 황련 메탄올 추출물 원액의 농도는 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13 mg/ml이었으며, 11번째 실리카겔 크로마토그래피 분획물의 농도는 100, 50, 25, 12.5  $\mu$ g/ml이었다.

## 결 과

뮤탄스 연쇄구균(*S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup>와 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>)에 대한 황련 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피하여 얻은 분획물의 항균활성을 최소살균농도 값 측정으로 알아본 결과 F11과 F12 분획물이 가장 좋은 항균활성을 보였다(Table 1). F10 분획물의 경우 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>에서만 본 실험에서 실험한 농도 안에서 최소살균농도 값을 가졌다(Table 1). 황련 메탄올 추출물 원액에 대한 뮤탄스 연쇄구균의 최소살균농도 값은 선행연구에서 얻은 결과이다[19].

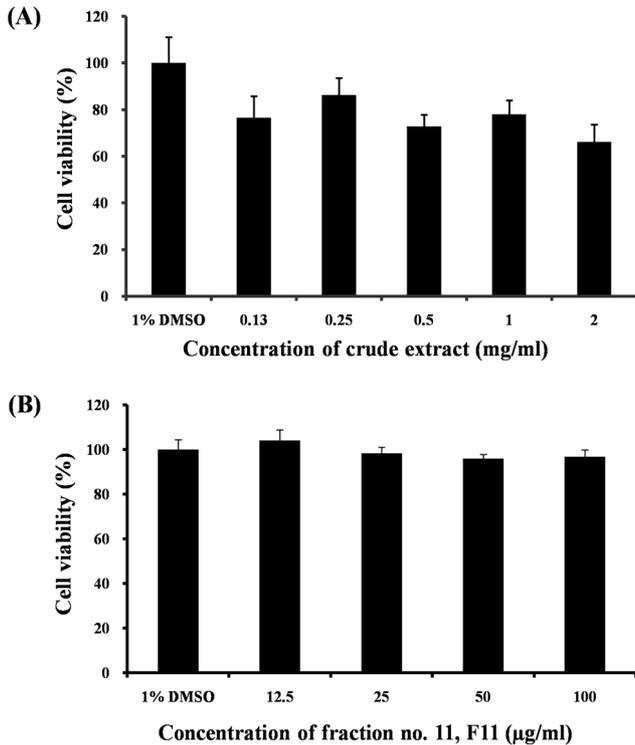
황련 메탄올 추출물 원액과 실리카 겔 크로마토그래피 분획물들의 4종 치주질환 원인균(*P. gingivalis* ATCC 33277<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *T. denticola* ATCC 35405<sup>T</sup> 및 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>)에 대한 항균능 결과는 Table 1과 같았다. 황련 메탄올 추출물 원액의 경우 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>

**Table 1.** Minimum bactericidal concentration of crude extracts or silica gel chromatography fractions of methanol-extracted *Coptidis rhizome* against oral pathogens

Species and strains	Minimum bactericidal concentration ( $\mu$ g/ml)																				
	CR	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
<i>S. mutans</i> ATCC 25175 <sup>T</sup>	250*	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	50	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 <sup>T</sup>	500*	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	12.5	6.25	25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 <sup>T</sup>	250	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	6.25	12.5	25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611 <sup>T</sup>	250	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	6.25	6.25	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>T. denticola</i> ATCC 35405 <sup>T</sup>	1,000	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	6.25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384 <sup>T</sup>	>1,000	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	12.5	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50

CR, crude extract of methanol-extracted *Coptidis rhizome*; F, silica gel chromatography fraction of methanol-extracted *Coptidis rhizome*; ATCC, American Type Culture Collection.

\*These data were obtained in previous study [19].



**Fig. 1.** Cell viability test of the crude methanol-extract of *Coptidius rhizome* and 11th fraction of silica gel chromatography of it on KB cells.

를 제외한 3 종 치주질환 원인균에 대해서 250-1,000 µg/ml 범위에서 최소살균농도 값을 가졌다(Table 1). 실리카겔 크로마토그래피 분획물들 중에서 F11 분획물이 가장 좋은 항균능을 가졌으며, 이때 6.25-12.5 µg/ml 범위에서 최소살균농도 값을 보였다(Table 1). 또한 F10, F12 및 F13 분획물들도 1균주 이상의 치주질환 원인균에 대해 50 µg/ml 이하의 농도에서 최소살균농도 값을 보였다(Table 1).

본 연구에서 사용된 균주에 대한 항균 활성을 갖는 황련 메탄올 추출물 원액 및 가장 항균능이 좋은 F11 분획물의 세포 독성을 KB 세포주를 이용하여 MTT 분석법으로 조사 하였다(Fig. 1). 그 결과 황련 메탄올 추출물 원액은 0.13-1 mg/ml 농도에서 72.8-86.2%의 세포 생존율을 보였다. F11 분획물의 경우, 100 µg/ml 농도에서도 KB 세포의 생존율이 96.7%로 세포 독성이 거의 없는 것으로 조사되었다.

## 고 찰

본 연구 결과, 황련 메탄올 추출물 실리카 겔 크로마토그래피 F11 (n-hexane : ethyl acetate 비율이 7:3-III) 분

획물이 본 연구에서 사용된 6균주의 뮤탄스 연쇄구균 및 치주질환 원인균에 대하여 6.25-50 µg/ml 범위에서 항균능을 가졌다(Table 1). 또한 F11 실리카 겔 크로마토그래피 분획물은 100 µg/ml 농도까지 KB 세포주에 대한 세포 독성이 거의 없었다(Fig. 1).

최근 황련의 물 추출물 62.5 mg/ml 농도에서 *S. mutans* (ATCC 25175<sup>T</sup> 및 CCRC 10793), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49259 및 CCRC 15273) 및 *P. gingivalis* (ATCC 33277<sup>T</sup> 및 CCRC 14417) 등의 구강 세균 균주들이 100% 성장이 억제됨이 보고되었다[16]. 하지만, 본 연구를 제외하고는 황련 물 또는 메탄올 추출물에 대한 구강 세균에 대한 항균능을 조사한 연구는 없는 실정이다. 이러한 이유는 현재까지는 확실하지 않지만, 황련이 항균 기능보다는 항염 기능에 맞추어서 많이 사용되었기 때문이라 생각된다[15,16].

선행 연구에서 황련 메탄올 추출물 원액의 55 균주의 뮤탄스 연쇄구균(*S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup>, *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>) 및 한국인 구강에서 얻은 39 균주의 *S. mutans*와 14 균주의 *S. sobrinus*에 대한 최소살균농도 값을 구하여 균주에 따른 항균능 차이를 조사하였다[19]. 그 결과 한국인에서 분리동정된 *S. mutans* 및 *S. sobrinus* 균주들은 각각 90% 및 13.3%가 각각의 표준균주들인 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> 및 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>들보다 황련 메탄올 추출물 원액에 대해서 더 높은 최소살균농도 값을 보였다[19]. 또한 한국인 구강에서 얻은 *S. mutans* (39 균주)와 *S. sobrinus* (14 균주)에 대한 최소살균농도 값도 각각 0.125-1 mg/ml 및 0.25-1.0 mg/ml 범위를 보였다[19]. 이는 같은 종(species)에 속하는 균주라도 황련 메탄올 추출물에 대한 저항성이 매우 다를 수 있다는 것을 의미한다. 아직 서양인에서 분리동정된 많은 뮤탄스 연쇄구균 균주들에 대한 황련을 포함한 여러 천연물의 메탄올 추출물에 대한 항균능을 조사해 보지 않았지만, 숙주 인종에 따른 분리된 균주들의 천연물 추출물의 항균농도 차이가 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과를 토대로 한국인을 대상으로 사용할 구강위생용품 개발 시 사용될 항균물질들의 항균능 비교와 적정 농도를 정하기 위한 세균모델시스템이 소개되었다[19]. 그러므로 차 후 연구에서 세균모델시스템을 이용하여 본 연구에서 얻은 항균능이 가장 뛰어난 황련 메탄올 추출물의 실리카 겔 크로마토그래피 분획물인 F11의 치아우식증 예방을 위한 구강위생용품 개발 시 적정 농도를 결정하는 실험이 필요하리라 생각된다. 또한 F11 분획물의 치주질환 예방을 위해 항균물질로 사용하기 위해, 세포 독성이 없으면서 한국인에서 분리 동정된 여러 치주질환 원인균에 대한 항균능을 갖는 적정

농도도 측정하여야 할 것이다.

이상의 연구결과들을 종합할 때, 황련 메탄올 추출물 크로마토그래피 분획물 F11은 50-100 µg/ml 농도로 치아우식증 및 치주질환 예방 목적으로 사용될 치약 및 구강양치용액 등의 향균 성분으로 이용 가능할 것으로 생각된다.

---

## 감사의 글

이 논문은 2015학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

---

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

---

## References

- Loeshe WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50:353-380.
- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45:406-408. Erratum in: *Int J Syst Bacteriol.* 1995;45:882.
- Genco R, Offenbacher S, Beck J. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *J Am Dent Assoc.* 2002;133(Suppl):14S-22S.
- Kumar PS. Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe* 2013;24:90-93. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.09.010.
- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:547-558. doi: 10.1128/CMR.13.4.547-558.2000.
- Usin MM, Menso J, Rodríguez VI, González A, Tabares S, Parodi R, Sembaj A. Association between maternal periodontitis and preterm and/or low birth weight infants in normal pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;14:1-20. doi: 10.3109/14767058.2014.987751.
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:12-32.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111. doi: 10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x.
- Kim CS, Park SN, Ahn SJ, Seo YW, Lee YJ, Lim YK, Freire MO, Cho E, Kook JK. Antimicrobial effect of sophoraflavanone G isolated from *Sophora flavescens* against mutans streptococci. *Anaerobe* 2013;19:17-21. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.11.003.
- Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and α-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe* 2012;18:369-372. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.001.
- Lee ES, Ahn TY, Yoon JJ, Kook JK, Lee BR, Kim DK. Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. *J Korean Acad Dent Health.* 2003;27:569-569.
- Park SN, Lim YK, Cho E, Jo E, Park PS, Kook JK. Antimicrobial activity of mulberry leaf against mutans streptococci and periodontopathogens. *Int J Oral Biol.* 2014;39:201-206. doi: http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2014.39.4.201.
- Jiang S, Du P, An L, Yuan G, Sun Z. Anti-diabetic effect of *Coptis Chinensis* polysaccharide in high-fat diet with STZ-induced diabetic mice. *Int J Biol Macromol.* 2013;55:118-22. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.12.035.
- Chae SH, Jeong IH, Choi DH, Oh JW, Ahn YJ. Growth-inhibiting effects of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids on human intestinal bacteria. *J Agric Food Chem.* 1999;47:934-938.
- Cho JY, Kim AR, Park MH. Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. *Planta Med.* 2001;67:312-316. doi: 10.1055/s-2001-14322.
- Lin SJ, Chen CS, Lin SS, Chou MY, Shih HC, Lee IP, Kao CT, Ho CC, Chen FL, Ho YC, Hsieh KH, Huang CR, Yang CC. *In vitro* anti-microbial and *in vivo* cytokine modulating effects of different prepared Chinese herbal medicines. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:2078-2085. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.010.
- Park H, Kim MS, Jeon BH, Kim TK, Kim YM, Ahnn J, Kwon DY, Takaya Y, Wataya Y, Kim HS. Antimalarial activity of herbal extracts used in traditional medicine in Korea. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:1623-1624. doi: http://doi.org/10.1248/bpb.26.1623.
- Kim MJ, Kim CS, Ha WH, Kim BH, Lim YK, Park SN, Cho YJ, Kim M, Ko JH, Kwon SS, Ko YM, Kook JK. Antimicrobial effects of oleanolic acid against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolated from a Korean population. *Int J Oral Biol.* 2010;35:191-195.
- Kim MJ, Kim CS, Park JY, Park SN, Yoo SY, Lee SY, Kook JK. Bacterial model system for screening and determining optimal concentration of anti-caries natural extracts. *J Microbiol.* 2011;49:165-168. doi: 10.1007/s12275-011-1018-0.