

## 빈랑의 *Streptococcus mutans* JC-2의 산생성 억제효과와 세포독성에 대한 연구

원광보건전문대학 치위생과

이광희 · 남용옥

### Abstract

#### A STUDY ON THE INHIBITORY EFFECT OF *ARECA CATECHU L.* ON THE ACID PRODUCTION OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* JC-2 AND ITS CYTOTOXICITY

Gwang-Hee Lee, Yong-Ok Nam

*Dept. of Dental Hygiene, Wonkwang Public Health College*

In order to develop natural anticariogenic agents, we investigated inhibitory effects of *Areca catechu L.* extracts on the acid production of *Streptococcus mutans* JC-2 and its cytotoxicity on NIH 3T3 fibroblasts were also examined.

The results are as follows :

1. Major organic acid produced by *Streptococcus mutans* JC-2 were lactic acid and acetic acid, and their productions were decreased by additions of *Areca catechu L.* extracts.
2. *Areca catechu L.* extracts were showed noncytotoxicity on NIH 3T3 fibroblasts.

이 논문은 1997년도 원광보건전문대학의 교비 지원에 의해서 연구됨.

## I. 서 론

치아우식증은 현재 전세계적으로 가장 널리 만연되고 있는 문화병의 하나이며 치아상실의 가장 중요한 원인 질환이다. 치아우식증은 세균, 음식물, 타액등의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로 치면세균막은 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이며, *S. mutans*는 치면의 부착, 증식 및 산생성과정을 거쳐 치아우식증을 유발한다<sup>1)</sup>.

즉 *S. mutans*는 세포벽에 존재하는 획득피막 결합단백을 매개로 치면의 획득피막에 부착한후 glucosyltransferase를 생성하여 음식물에 존재하는 sucrose로부터 포도당 중합체인 점착성의 비수용성 glucan을 형성한다. 형성된 glucan은 치면의 세균간의 결합을 증가시켜 *S. mutans*가 치면에 부착하여 당의 대사과정에서 유기산을 형성하여 치질을 탈회시킨다. 이때 생성되는 산이 lactic acid이며, 이 lactic acid가 법랑질을 탈회시켜 치아우식증을 야기한다<sup>2-4)</sup>.

최근 치아우식증을 예방하기 위해 발생기전에 대한 기초적인 연구와 함께 예방적 측면에서 매우 활발한 연구가 이루어져 왔다. 가장 기본적인 치아우식예방법은 잇솔질에 의한 기계적인 방법이다. 그러나 행동이 부자유한 소아나 신체장애자에게 적용하기에는 어려운점이 있으며, 소와 열구내의 세균을 제거하기에는 한계가 있다. 따라서 치아우식예방법질의 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 불소이용법, 면역학적 방법, 천연추출물등을 이용하는 방법들이 있다.

불소는 상수도 불소화, 치약, 식품등에 첨가하여 다양하게 사용되고 있으나 치아불소증(dental fluorosis)등의 부작용이 보고되고 있어 그 농도에 대한 논란이 계속되고 있다<sup>5)</sup>. 한편 치아우식증이 세균에 의한 것이므로 대표적 세균인 *S. mutans*의 항원을 이용한 예방 vaccine이 연구되고 있으나 아직까지 실용화되지 못한 실정이다<sup>4)</sup>. 따라서 최근에는 천연물을 대상으로한 *S. mutans*의 생육억제효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>6-8)</sup>.

본 연구의 목적은 한의학에서 항 virus 및 항진균, 구충, 건위등의 약리효과가 이미 알려

져있는 빈랑(*Areca catechu L.*)을 이용하여 치아우식원인균인 *S. mutans* JC-2의 산생생억제 효과와 세포에 대한 독성을 평가하여 치아우식예방제제로의 개발가능성을 규명하고자 함이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 빈랑추출물의 제조

본 연구에 사용된 빈랑은 시중의 한약재료 상에서 구입하고 음건후 분쇄하여 건조 빈랑 100g에 증류수 또는 메탄올(Hayman limited Co.) 100ml를 가하여 80°C의 water bath상에서 3시간동안 환류 추출하였다. 빈랑의 물 또는 메탄올 추출액을 여과(Whatman No. 41)한후 evaporator(Kikakikai Co., Japan)로 농축하고 freezer dryer(B. Braun, W. Germany)로 동결 건조하여 추출물 분말을 얻었다. 배양액만으로 배양한 경우를 대조군으로 하고, 실험군은 빈랑추출물을 500, 1000, 2000ppm을 첨가하여 배양하였다.

#### 2) 사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 원광대학교 구강미생물학 교실에서 분양받은 *S. mutans* JC-2로 실험에 사용하기전 Brain Heart Infusion broth에서 3회 계대 배양하여 사용하였다.

#### 3) 세포독성실험에 사용된 세포

cell line에서 분양받은 백서의 미부에서 분리한 NIH 3T3 섬유아세포를 3-4회 계대배양하여 사용하였다.

### 2. 실험방법

1) HPLC를 이용한 배양액 중의 유기산 분석  
*S. mutans* JC-2에 의해 생성된 유기산을 정량하기 위해 배양액 25ml를 취하고 1N-NaOH를 이용하여 pH를 8.3-8.6으로 맞추고 3차례 증류수를 가하여 50ml로 한다음 1분간 흔들었다. 이것을 screw cap tube에 넣고 3000rpm에서 5분간 원심분리하여 Milipore filter(pore size : 0.5µm)로 여과한 후 HPLC에 20µl씩 주입하였다. 빈랑의 첨가 농도는 무첨가(control), 500,

1000, 2000ppm으로 하고, 배양시간은 직후와 24시간 배양후의 산의 농도를 측정하였다. HPLC분석조건은 Table 1과 같다. 이때 표준 시료는 lactic acid, acetic acid, formic acid, citric acid 및 propionic acid가 각각 0.1% 씩 들어 있는 혼합액을 사용하였으며 대조군의 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

2) 빈랑의 NIH 3T3 섬유아세포에 대한 독성 실험

(1) 세포배양

cell line에서 공급받은 NIH 3T3 섬유아세포를 배양용기(25cm<sup>2</sup> Flask, Nunc.)에서 stock culture한 후 3-4회 계대배양하여 사용하였다. 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25µg/ml) 및 fungizone(0.25µg/ml)을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조정된 항온기내에서 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 세포수는 trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨후, 0.2% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 산정하였다.

(2) MTT(Tetrazolium MTT) 정량

Mosmann의 방법<sup>9)</sup>에 의하여, 세포를 500 ppm, 1000ppm, 2000ppm의 빈랑물추출물, 같은 농도의 빈랑메탄추출물을 첨가한 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 2ml/well씩 넣어 5분간 실온에 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, Elisa leader(540nm)로

MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

(3) NR(Neutral red) 정량

Borenfreund와 Puerner 방법<sup>10)</sup>에 의하여 세포를 배양용기당 2.0×10<sup>4</sup> cell/ml이 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후, 500, 1000, 2000ppm의 빈랑물추출물과 같은 농도의 빈랑메탄추출물이 포함된 배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양한다음 50µg/ml의 neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후, well당 1ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척하여 1% formaldehyde-1% CaCl<sub>2</sub>를 넣어 실온에 방치하여 3시간 동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의

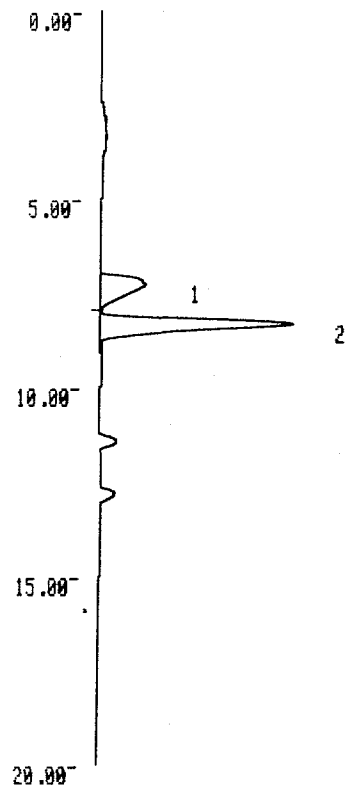


Fig. 1. HPLC chromatogram of control group. The peak 1 was showed lactic acid, peak 2 was acetic acid.

Table 1. Analysis condition for HPLC

Instrument	Waters, USA
Column	Waters <sup>TM</sup> µ-Bondapak C <sub>18</sub>
Mobile phase	0.009M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flow	0.5ml/min
Detector	UV 220nm Detector
Column temperature	35°C

흡광도를 Elisa reader(550nm)로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

(4) SRB(Sulforhodamine protein B) 정량

Skehan등의 방법(11)에 따라 세포를  $2.0 \times 10^4$  cell/well이 되도록 조절하여 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 빈랑물추출물 및 메탄올추출물이 각각 500, 1000, 2000ppm이 포함된 배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 버리고 PBS용액으로 5회 세척하고 0.4% sulforhodamine protein B (SRB)를 200 $\mu$ g씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10mM Tris base [tris(hydroxymethyl)aminomethane]로 bound protein stain을 녹인 후 흡광도는 Elisa reader (510 또는 540nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하였고 P-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 실험성적

1. 빈랑첨가 배양액중의 유기산 분석

*S. mutans* JC-2가 생성하는 유기산을 HPLC를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. 측정된 유기산은 lactic acid와 acetic

acid이며 formic acid, citric acid 및 propionic acid는 측정되지 않았다. 대조군의 경우 24시간 배양후 lactic acid가 1.91배, acetic acid가 1.07배 증가하였으나 빈랑물추출물을 첨가하여 배양한 군에서는 24시간 배양후 lactic acid, acetic acid 둘다 처음보다 산생성량이 감소하였다.

빈랑메탄올추출물의 경우 24시간 배양후에 lactic acid는 생성량이 증가하였으나 대조군보다는 증가폭이 적었고, acetic acid는 생성량이 감소하였다.

2. 빈랑의 NIH 3T3 섬유아세포에 대한 독성실험

빈랑에 대한 세포독성 실험은 MTT, NR 및 SRB정량법을 이용하여 세포의 활성도를 대조군의 경우를 100%로 하고 실험군을 비교하였다.

1) MTT(Tetrazolium MTT) 정량

배양액만으로 배양한 군을 대조군(control), 빈랑을 500, 1000 및 2000ppm 첨가한 군을 실험군으로 하여 48시간 배양한 후, MTT 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100으로 하여 각군의 흡광도를 비례적으로 산정하였다 (Table 2. 참조).

빈랑물추출물을 첨가한 경우 500ppm에서는

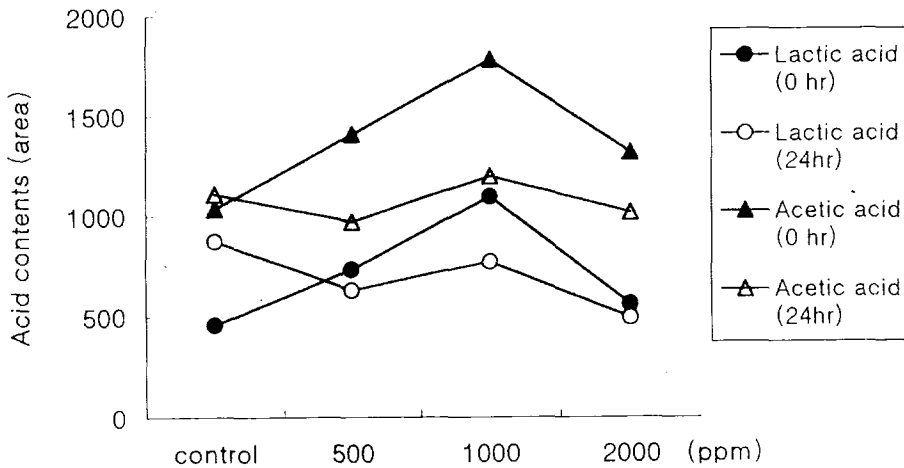


Fig. 2. Contents of some organic acid produced by *S. mutans* JC-2 in broth system containing water extract of *Areca catechu* L.

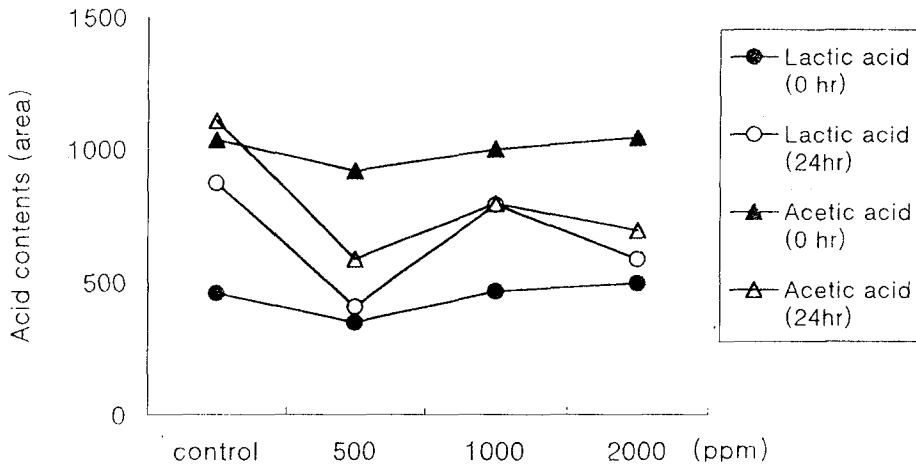


Fig. 3. Contents of some organic acid produced by *S. mutans* JC-2 in broth system containing methanol extract of *Areca catechu* L.

Table 2. The results of MTT assay on the cytotoxicity of *Areca catechu* L. on cultured NIH 3T3 fibroblasts.

Concentration of <i>Areca catechu</i> L. (ppm)	absorbance(%)	
	water extract	methanol extract
control	4.033± 0.196 (100.0)	4.196± 0.004 (100.0)
500	4.039± 0.138 (100.1)	4.192± 0.015 (99.9)
1000	3.893± 0.182 (96.5)	4.159± 0.081 (99.1)
2000	4.096± 0.072 (101.5)	4.061± 0.196 (96.8)

The data were Mean± S.D. (% of control)

거의 변화가 없었으며, 1000ppm에서는 3.5% 감소, 2000ppm에서는 오히려 흡광도가 대조군보다 1.5% 증가 하였다. 빈랑메탄올추출물을 첨가한 경우 500ppm에서는 0.1%, 1000ppm에서는 0.9%, 그리고 2000ppm에서는 3.2%가 감소하여 빈랑의 농도가 증가할수록 세포의 활성도가 감소하는 경향이였다(Table 2. 참조).

2) NR(Neutral red)정량 배양액만으로 배양한 균을 대조군, 빈랑물추출물 500, 1000, 2000 ppm을 첨가하여 배양한 균을 실험군으로 하여 48시간 배양한 후 NR의 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100으로 하여 각 군의 흡광도를 비례적으로 산정하였다(Table 3. 참조).

빈랑물추출물을 500, 1000ppm 첨가한 경우 세포의 활성도가 대조군에 비해 각각 13.1%, 14.3% 감소하였으며, 2000ppm첨가군에서는 0.5% 감소로 세포의 활성도가 회복된 것이 관찰되었다. 빈랑메탄올추출물의 경우 빈랑의 첨가량이 증가할수록 4.4%, 5.9%, 6.1%로 세포의 활성도가 저해됨이 관찰되었다(Table 3. 참조).

3) SRB(Sulforhodamine protein B)정량 배양액만으로 배양한 균을 대조군, 빈랑물추출물과 메탄올추출물을 500ppm, 1000ppm, 2000ppm을 첨가한 균을 실험군으로하여 48시간 배양한 후 sulforhodamine protein B량을 측정한 결과 Table 4.와 같다. 빈랑물추출물의

Table 3. The results of NR assay on the cytotoxicity of *Areca catechu L.* on cultured NIH 3T3 fibroblasts.

Concentration of <i>Areca catechu L.</i> (ppm)	absorbance(%)	
	water extract	methanol extract
control	2.818± 0.447 (100.0)	3.529± 0.083 (100.0)
500	2.451± 0.962 (86.9)	3.372± 0.184 (95.6)
1000	2.415± 0.358 (85.7)	3.320± 0.226 (94.1)
2000	2.805± 0.365 (99.5)	3.314± 0.199 (93.9)

The data were Mean± S.D. (% of control)

Table 4. The results of SRB assay on the cytotoxicity of *Areca catechu L.* on cultured NIH 3T3 fibroblasts.

Concentration of <i>Areca catechu L.</i> (ppm)	absorbance(%)	
	water extract	methanol extract
control	2.870± 0.022 (100.0)	2.293± 0.026 (100.0)
500	2.856± 0.057 (99.5)	2.883± 0.021 (98.6)
1000	2.839± 0.023 (98.9)	2.872± 0.031 (98.3)
2000	2.757± 0.050 (96.1)	2.784± 0.045 (95.2)

The data were Mean± S.D. (% of control)

경우 농도가 증가할수록 단백질량이 감소하였으나 그양은 0.5, 1.1, 3.9%로 약간 감소하는데 그쳤다. 빈랑메탄추출물의 경우도 마찬가지로 1.4, 1.7, 4.8%가 대조군에 비해 감소하여 세포의 독성이 미약하게 나타났다.

#### IV. 총괄 및 고안

치아우식증은 세균, 음식물, 타액등의 상호작용에 의해 유발된다. 치아우식증에 관계있는 세균은 *S. mutans*로 glycosyltransferase에 의해 sucrose로부터 점착성 glucan을 형성하여 치아에 부착되고 당을 대사하는 과정에 유기산을 생성하여 치질을 탈회시킨다<sup>1)</sup>. 따라서 치아우식증을 예방하기 위해서는 *S. mutans*의 치면 부착능력을 감소시키고 산생성을 억제시켜 치아의 우식저항성을 증가시켜야 할 것이다. 이를 위한 물질을 찾는 연구가 다양하게 진행중이며 빈랑도 그중 하나이다.

빈랑은 주성분이 tannin, chebulic acid 및

chebulin등의 phenolic 화합물과 arecadine 및 arecolin등과 같은 alkaloid류로 이런 성분들은 항균활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 특히 phenolic화합물의 OH기는 미생물중 효소단백질의 아미드결합부위와 수소결합을 함으로써 효소활성을 비선택적으로 저해하는 효과가 있는 것으로 보고 되고 있고 수소공여능이 강하여 항균, 항산화효과가 큰 것으로 알려져 있다<sup>13,14)</sup>. 또한 김<sup>15)</sup>의 연구에 의하면 장내 유해세균에 대한 빈랑의 항균효과는 phenolic화합물에 의한 시험균의 세포막에 존재하는 여러 가지 active transport protein(permease)나 단백질합성의 활성이 저해되어 생육이 억제되었거나 세포질 내로 유입된 phenolic화합물에 의해 각종 대사 과정에 관여하는 효소의 활성을 저해하여 그 생육이 억제되어 나타난 것으로 보고하였다.

이에 본 연구는 이전의 이와 남<sup>16)</sup>의 연구에서 빈랑이 *S. mutans* JC-2의 생육과 glycosyltransferase의 활성을 억제하는 효과가 있다고 보고한 것에 대한 연구의 계속으로 빈랑의 *S. mutans*의

유기산생성 억제효과를 관찰하였다.

*S. mutans* JC-2에 의해 생성되는 유기산은 homolactic fermentation에 의해서 gas formation 없이 주로 lactic acid만 생성되지만 glucose-limited condition에서는 lactic acid외에 acetic acid 및 formic acid등의 다른 유기산도 생성하는 것으로 보고되고있어 본 실험에서도 lactic acid, acetic acid, formic acid, citric acid 및 propionic acid를 대상으로 측정 분석한 결과, 대조군과 실험군 모두 formic acid, citric acid 및 propionic acid는 생성이 관찰되지 않았다 (Fig. 2, 3 참조). 이와 같이 *S. mutans* JC-2에 의해 생성되는 주요 유기산은 lactic acid와 acetic acid였다.

대조군의 경우 24시간 배양후 lactic acid가 1.91배, acetic acid가 1.07배 증가하였으나 빈랑물추출물을 첨가하여 배양한 군에서는 24시간 배양후 lactic acid, acetic acid 둘다 처음보다 산생성량이 감소하였다. 이것으로 빈랑물추출물이 *S. mutans* JC-2의 산생성을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있으며, 이것은 *S. mutans* JC-2에 빈랑을 첨가하여 배양한 경우가 대조군에 비해 배양액의 pH의 감소폭이 적게 나타났다고 하는 이전의 연구<sup>16)</sup>와 일치함을 알 수 있다. 빈랑메탄올추출물의 경우 24시간 배양후에 lactic acid는 산생성량이 증가하였으나 대조군보다는 증가폭이 적었고, acetic acid는 생성량이 감소하였다. 따라서 물추출물이 메탄올추출물에 비해 산생성을 억제하는 효과가 더 큰 것으로 여겨지므로 치아우식예방제에는 물추출물이 더 효과적이라 여겨진다.

치아우식예방제는 세균에 대한 항균효과와 함께 인체에 해가 없어야 하므로 in vitro 실험으로 빈랑의 세포에 대한 독성을 실험하였다. 빈랑을 NIH 3T3 fibroblast에 접촉시켜 48시간동안 배양한 후 MTT(사립체의 SDH활성도)정량, NR(neutral red uptake 능력)정량 및 SRB(sulfohodamine B protein)정량으로 세포에 대한 독성을 평가한 결과 빈랑물추출물의 경우  $MTT_{50}=49053.0\text{ppm}$ ,  $NR_{50}=42023.0\text{ppm}$ ,  $SRB_{50}=25188.0\text{ppm}$ 이며, 빈랑메탄올추출물의 경우  $MTT_{50}=25214.5\text{ppm}$ ,  $NR_{50}=16084.67$

ppm,  $SRB_{50}=25027.5\text{ppm}$  였다. Borenfreund등<sup>10)</sup>의 독성판정기준에 의하면 MTT, NR의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포가 독성을 받기 시작하는 농도를  $MTT_{90}$ ,  $NR_{90}$  으로하고 심한 독성을 받은 농도를  $MTT_{50}$ ,  $NR_{50}$  으로 결정한 후  $MTT_{50}$ ,  $NR_{50}$ 이  $100\mu\text{M}$ 미만 일때를 고독성,  $100-1000\mu\text{M}$ 사이일때를 중간독성,  $1000-2000\mu\text{M}$ 사이 일때를 저독성,  $2000\mu\text{M}$ 이상 일때를 무독성이라고 하였으므로, 빈랑물추출물과 메탄올추출물 모두 무독성으로 분류할 수 있다.

이상의 연구결과로 볼 때 빈랑은 *S. mutans* JC-2의 산생성을 억제하는 효과가 있으며, NIH 3T3 섬유아세포에 대해 독성이 거의 없다고 여겨진다. 그리고 이전의 이와 남<sup>16)</sup>의 연구에서 관찰된 *S. mutans* JC-2의 생육억제와 glucosyltransferase의 효소 활성억제효과등으로 볼 때 빈랑은 치아우식예방가능성이 많은 제재로 사료된다. 하지만 빈랑의 *S. mutans* JC-2 이외의 *S. mutans* 균주에 대한 생육억제효과등과 정확한 빈랑의 항우식 기전, 가장 효과적인 빈랑의 첨가 농도등이 더 연구되어야 하며, 빈랑이 천연물이므로 정확한 성분에 대한 분석등의 지속적인 연구가 필요하리라 여겨진다.

## V. 결 론

천연 치아우식 예방제를 개발하기 위한 기초실험을 수행하기 위해 한약재중 안정성이 인정되고 널리 사용되고 있는 빈랑추출물을 이용하여 *S. mutans* JC-2에 대한 산생성억제 효과와 NIH 3T3 fibroblast에 대한 세포독성 실험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *S. mutans* JC-2 배양액의 주요 유기산은 lactic acid와 acetic acid였으며, 빈랑추출물첨가로 이들 산생성량이 감소하는 경향이 있었다.
2. 빈랑추출물은 NIH 3T3 fibroblast에 대해 세포독성이 거의 없었다.

## Reference

1. Hamada S, Koga T, and Ooshima T : Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res, 63 : 407-411, 1984.
2. Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, Malamud D, and Rosan B : Salivary agglutinin mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. Infect Immun, 59 : 3446-3450, 1991.
3. Van Houte J : Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res, 73(3) : 672-681, 1994.
4. 이진용 : 구강질환의 미생물학적 이해. 대한치과의사협회지, 32(9) : 630-637, 1994.
5. Riordan JJ : Dental fluorosis, Dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds. Caries Res, 27 : 21-77, 1993.
6. Wu-Yuan CD : In vitro screening of chinese madical toothpastes : Their effects on growth and plaque formation of Mutans Streptococci. Caries Res, 24 : 198-202, 1990.
7. 강성호 : 수종의 차 음료가 *Streptococcus mutans*의 성장에 미치는 영향에 관한 연구. 대한구강보건학회지, 14(1) : 137-146, 1990.
8. 유윤정, 광월아, 조장기, 장희순, 권호근, 이승일, 박용석, 박제한 : 자몽씨, 결명자 및 당귀에 의한 *Streptococcus mutans*의 증식 억제효과. 대한구강보건학회지, 20(1) : 107-120, 1996.
9. Mosmann T : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival ; application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65 : 55-63, 1983.
10. Borenfreund E, and Puerner JA : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay(HTD/Nr-90). J Tissue Culture Meth, 9 : 7-9, 1984.
11. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Visterca D, Warren JT, Bokesch H, Kenny S, and Boyd MR : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J Natl Cancer Inst 82 (13) : 1107-1112, 1990.
12. 이상인 : 한약임상응용, 정보사 pp392-393, 123-124, 1990.
13. 조영제, 안봉전, 최청 : 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angitensin Converting Enzyme 저해효과. 한국식품과학회지, 25 : 238, 1993.
14. 전체옥, 서유탉, 전기봉, 심영철, 박원제 : 천연물로부터 *Streptococcus mutans* 및 glucosyltransferase저해제개발. 대한치주연구소 산학연 학술심포지움, 49-63. 1993.
15. 김성효 : 한약재추출물의 장내유해세균에 대한 생육억제효과, 원광대학교 석사학위논문, 1995.
16. 이광희, 남용옥 : *Streptococcus mutans* JC-2의 생육에 미치는 빈랑의 억제효과. 대한치과보존학회지, 20(2) : 839-842, 1995.