

## 자일리톨 섭취에 따른 *Streptococcus mutans*의 글루칸 생성관련 유전자 발현 억제효과

김지혜 · 이영은 · 안상현\* · 최연희 · 남순현\*\* · 송근배

경북대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, \*동국대학교 의과대학 치과학교실,

\*\*경북대학교 치의학전문대학원 소아치과학교실

### 국문초록

본 연구에서는 장기적인 자일리톨의 섭취가 *Streptococcus mutans*의 대표적인 독성인자 중 하나인 글루칸 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 글루칸 합성효소인 glucosyltransferase의 mRNA 발현을 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 24개월 동안 자일리톨검을 섭취한 군에서 타액 내 *Streptococcus mutans*의 colony 수는 통계적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).
2. 비수용성 글루칸 합성에 관여하는 유전자인 *gtfB*, *gtfC*의 발현은 자일리톨검을 섭취한 군에서 시간이 지남에 따라 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 특히 *gtfB*의 발현은 12개월과 24개월째 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았고, *gtfC*의 발현은 24개월째 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).
3. 수용성 글루칸 합성에 관여하는 유전자인 *gtfD*의 발현 역시 자일리톨검을 섭취한 군에서 시간이 지남에 따라 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 *gtfD*의 발현은 12개월과 24개월째 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).

이상의 결과들을 종합해 보았을 때, 자일리톨의 섭취는 구강 내 *Streptococcus mutans*의 글루칸 합성 관련 유전자들의 발현을 억제시킴으로써 *Streptococcus mutans*의 수적인 감소를 가져오는 것으로 생각된다.

**주요어 :** 글루칸 생성관련 유전자, *Streptococcus mutans*, 자일리톨

### I. 서론

*Streptococcus mutans*(*S. mutans*)는 치아우식증의 주 원인균으로<sup>1)</sup>, glucosyltransferase(GTF)와 fructosyltransferase(FTF)를 사용하여 자당(sucrose)으로부터 글루칸(glucan)과 프럭탄(fructan)을 생산한다<sup>2)</sup>. 글루칸은 점착성이 있어 치면에 *S. mutans*의 부착을 용이하게 하고, 각종 세균들을 응집시켜 치면세균막을 형성한다<sup>3)</sup>. 프럭탄 역시 세포 바깥의 저장 물질로서 작용함과 동시에 세균들의 결합 장소로 작용하여 세균 축적을 용이하게 하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. *S. mutans*가 생산하는 글루칸은 수용성 글루칸인 텍스트란(dextran)과 비수용성 글루칸인 뮤탄(mutan)으로 나눌 수 있는데, 특히 비수용성 글루칸은 물에 녹지 않는 성질과 점성을 가지고 있어 구강

내 세균이 치면에 부착하는 것을 용이하게 하고 치면세균막의 골조역할을 하며, *gtfB*, *gtfC* 유전자에 의해 합성되는 GTFB와 GTFC 효소의 작용으로 생성된다. 수용성 글루칸은 주로 세균들의 에너지원으로 이용되며, *gtfD* 유전자에 의해 합성되는 GTFD의 작용으로 생성된다<sup>5-7)</sup>. 한편 *S. mutans*는 음식으로 섭취한 탄수화물을 분해하여 젖산(lactic acid)과 같은 다양한 산을 생산하고, 구강 내 pH를 감소시켜 법랑질 탈회를 일으킬 뿐만 아니라<sup>8)</sup>, 같은 종의 다른 세균들에게 주로 살균 작용을 하는 뮤타신(mutancin)을 생산하여 세균 집합체의 형성을 위한 생태학적 이점을 제공한다<sup>9)</sup>. 이처럼 *S. mutans*는 자당 의존적인 부착, GTF 생산, 탄수화물의 분해, 산생성, 뮤타신 생성 등의 독성인자들을 가지며, 이러한 독성 인자들에 의해 치아우식증이 발생한다. 따라서 치아우식을 예방하기 위해서는 *S. mu-*

교신저자 : 송근배

대구광역시 중구 삼덕2가 50번지 / 경북대학교 치과대학 소아치과학교실 / 053-660-6870 / kbsong@knu.ac.kr

원고접수일: 2009년 04월 23일 / 원고최종수정일: 2009년 08월 05일 / 원고채택일: 2009년 08월 14일

\*이 논문은 2008년도 학술진흥재단 (KRF-2008-521-E00132)의 일부 지원과 충치예방연구회의 지원에 의하여 연구되었음.

tans의 증식을 억제하거나 독성인자를 억제시키는 것이 중요하다고 하겠다.

자일리톨(xylitol)은 1970년대 초 투르크 연구를 시작으로 치아우식 발생을 예방하는 대표적인 당 대체물질로 주목 받고 있다<sup>10)</sup>. 한 등<sup>11)</sup>은 만 5~6세 어린이를 대상으로 12개월간 자일리톨껌을 씹게 한 결과 대조군과 솔비톨껌을 씹은 군에 비해 치면세균막 내 *S. mutans*의 수가 확연히 감소됨은 물론 우식경험유치면적수도 두 군에 비해 상당히 감소하였다고 보고한 바 있다. 또한 많은 연구들에서 자일리톨 껌을 씹은 경우 타액과 치면세균막 내 *mutans streptococci*의 수가 감소되었다고 보고하였으며<sup>12,13)</sup>, Mäkinen 등<sup>14)</sup>과 Holgerson 등<sup>15)</sup>은 자일리톨의 섭취는 타액을 비롯한 치면세균막 내의 *S. mutans* 수의 감소 뿐 아니라 치면세균막 형성 자체를 감소시킨다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 *S. mutans*가 자일리톨을 섭취하게 되면, fructose phosphotransferase system(fru-PTS)에 의해 세포 내부로 운반되어 대사가 되지 않는 자일리톨 5-인산(X5P)이라는 독성물질로 축적되기 때문이다. X5P는 당 대사와 관련된 효소의 활성을 저해하여 세균 증식을 억제할 뿐만 아니라 세포내 축적된 X5P가 탈인산화되면서 세포 밖으로 배출되고, 배출된 자일리톨이 다시 세포안으로 운반되면서 에너지를 소모하는 무익회로를 만들어냄으로써 *S. mutans*의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. 한편, Gauthier 등<sup>17)</sup>은 *S. mutans*를 자일리톨이 포함된 배지에서 지속적으로 배양하면 자일리톨에 의해 성장이 억제되지 않는 자일리톨 내성균주가 형성된다고 보고하였으며, 몇몇 연구들에서도 장기간의 자일리톨을 섭취한 사람의 구강 내에서 내성균주의 출현을 보고한 바 있다<sup>18,19)</sup>. 자일리톨 내성균주는 fru-PTS가 없거나 활성이 매우 낮기 때문에 자일리톨의 세포내 유입과 인산화가 억제된다. 따라서 독성을 나타내는 X5P가 세포 내에 축적되지 않으므로 자일리톨에 의해 성장이 억제되지 않는다<sup>18-20)</sup>. 또한 이러한 자일리톨 내성균주는 감성균주보다 독성이 약하다는 보고들도 있다<sup>20,21)</sup>. 이처럼 자일리톨은 *S. mutans* 수의 감소뿐만 아니라 독성 억제에 매우 중요한 역할을 한다. 그러나 자일리톨과 *S. mutans*에 대한 여러 연구가 진행되고 있음에도 불구하고, *S. mutans*의 글루칸 생성 관련 유전자들의 발현에 있어서 자일리톨의 효과에 대한 연구는 많이 진행되지 못하였다<sup>22)</sup>. 또한 대부분의 연구들이 실험실 균주를 사용한 것이며, 구강 내에서 분리한 *S. mutans*의 글루칸 생성 관련 유전자 발현에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 24개월 이상 장기간 자일리톨 껌을 섭취하였을 때, 구강 내 *S. mutans*의 글루칸 생성과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

## II. 연구 대상 및 방법

본 연구는 경북대학교병원 연구윤리심의위원회(Institutional review board, IRB)의 승인을 받았으며(연구 74005-46), 연구대상자를 보건소에서 선정한 후 모집과정에서 연구의

취지와 목적을 설명하고, 사전 동의하에 시행되었다.

### 1. 연구 대상과 타액 채취

20명의 연구 대상자들을 대조군 10명과 자일리톨군 10명으로 무작위로 나누어 자일리톨군은 24개월 동안 하루 3회, 식후 5분 동안 자일리톨 껌(1.3 g 자일리톨/pellet) 2개씩을 씹도록 하였고, 매일 정기적으로 전화와 섭취일지를 제출하도록 하여 개별적인 자일리톨 껌 섭취에 대한 순응도를 확인하였다. 한편 대조군은 별도의 자일리톨 껌을 공급하지 않았으며, 매일 칫솔과 구강보건교육용 자료를 우송하였다. 초기, 12개월, 24개월에 각 연구대상자들에게 5분 동안 paraffin wax를 저작하도록 하여 자극성 타액을 채취하였고, 10% glycerol을 첨가하여 -80℃에서 급속 냉동시켜 분석 전까지 보관하였다.

### 2. *S. mutans*의 분리 및 colony count

타액으로부터 *S. mutans*를 선택적으로 배양하기 위해 0.2 U/ml의 bacitracin(Sigma Chemical, MO, USA)과 15% sucrose(Sigma Chemical, MO, USA)를 포함하는 Mitis salivarius agars(Difco Laboratories, MD, USA)(MSB)에 도말하여 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 배양기(Sanyo, Japan)에서 48시간 동안 배양하였으며, 전형적인 *S. mutans* 형태를 가지는 집락을 선정하여 colony-forming units(CFU)을 count하였다.

### 3. *S. mutans*의 동정

새로운 MSB에 *S. mutans*를 계대배양하여 순수 집락을 얻었고, 이를 brain heart infusion(BHI)에 접종하여 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. BHI배지에서 배양한 세균을 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 200 μl에 현탁하여 100℃에서 10분간 끓인 후 4℃에서 10분간 원심 분리하여 chromosomal DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 Nascimento 등<sup>23)</sup>의 실험에 근거하여 GTF genes에 특이적인 primers들을 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 시행하였다. 각 PCR 반응액은 1×reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM deoxynucleoside triphosphate(dNTP), 0.4 μM primer, 2.5 U Taq DNA polymerase(Super Bio, Korea), 2 μg DNA로 총 25 μl가 되게 구성하였으며, GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer-Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 PCR을 시행하였다. 각각의 PCR 산물은 detection level을 향상시키기 위하여 새로운 internal primer로 추가 PCR을 하였다<sup>23)</sup>. 모든 PCR 산물은 1.2% agarose gel을 이용하여 100 V에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

4. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)

BHI 배지 상에서 *S. mutans*를 OD<sub>600</sub>이 0.6이 될 때까지 배양한 후 Tri-Reagent(Molecular Research Center, OH, USA)을 사용하여 total RNA를 추출하고 UV/Visible Spectrophotometry(Amersham Biosciences, Sweden)로 정량하였다. RNA 2 µg으로부터 ImProm- II Reverse transcription system(Promega, WI, USA)을 사용하여 cDNA templates를 합성하였으며, ABsolute QPCR SYBR® Green Mixes(Applied Biosystems, CA, USA)로 ABI-Prism 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 실시간 중합연쇄반응을 시행하였다. 실험에 사용한 primer는 Shemesh 등<sup>24)</sup>의 실험에 근거하여 제작하였으며, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*의 발현양상을 확인하였다. 모든 유전자들의 발현 정도는 내부 standard로써 *S. mutans*의 16S rRNA를 사용해서 normalization 하였다. 분석은 적어도 두개의 독립적인 RNA 샘플을 duplicate로 시행하였다.

5. 통계 분석

수집된 모든 자료는 통계분석용 소프트웨어인 SPSS 14.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 각 그룹의 *S. mutans*의 수와 글루칸 생성 관련 유전자발현 정도에 있어 시간에 따른 자일리톨의 효과를 알아보기 위하여 Friedman test를 시행하였고, 분석결과 유의한 차이가 있을 경우 Bonferroni corrected Wilcoxon signed-rank test로 사후검정하였다. 또한 대조군과 자일리톨군 사이의 *S. mutans* 수와 글루칸 생성 관련 유전자발현 정도를 비교하기 위하여 각 시점에서 Mann-Whitney test를 시행하였다. 모든 통계분석에서 유의성 판정을 위한 유의수준은 5%로 고려하였다.

Ⅲ. 연구 성적

1. *S. mutans* 동정 결과

GTFB와 GTFI primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 모든 균주가 469 bp 위치에서 뚜렷한 DNA 밴드를 나타내었고, 664 bp 위치에서는 어떤 DNA 밴드도 나타나지 않았다. 따라서 20명의 대상자들로부터 분리된 모든 균주가 *S. mutans*임을 확인하였다(Fig. 1).

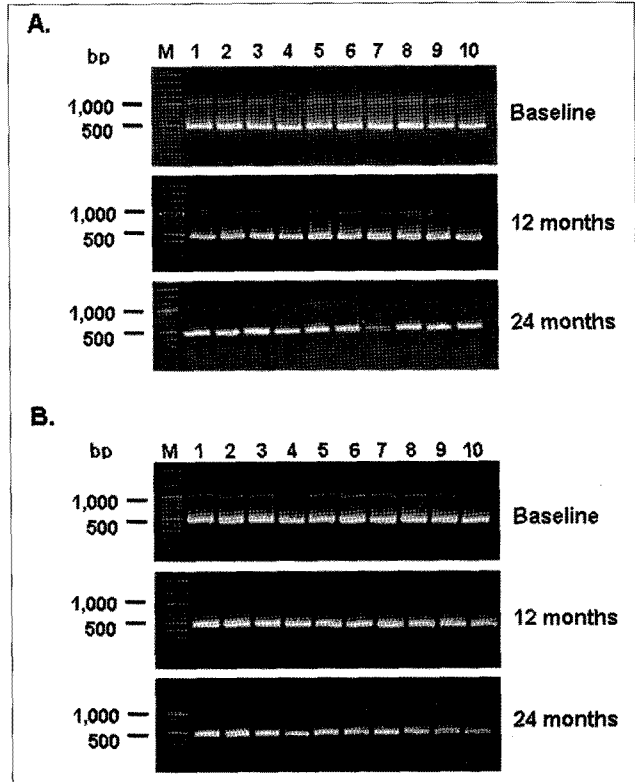


Fig. 1. The amplified *gtfB* gene(469 bp) of *S. mutans* from control group subjects and Xylitol group; Those DNA were produced by RT-PCR using GTFB primer and analyzed on 1.2% agarose gel; A: Control group strains; B : Xylitol group strains; Lane M: molecular size markers(100 bp DNA ladder, Bioneer, Korea); Numbers on each lane denote subject number.

2. 자일리톨 섭취에 따른 구강 내 *S. mutans*의 colony 수 변화

Table 1은 각 군별 시간에 따른 *S. mutans* 수를 분석한 결과이다. 초기의 두군 간의 *S. mutans* 수는 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). 또한 대조군에서는 시간이 지남에 따라 *S. mutans*의 수가 다소 감소하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). 반면, 자일리톨군에서는 시간이 지남에 따라 *S. mutans* 수가 주목할 정도로 감소하였고( $p < 0.05$ ), 특히 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의한 감소를 보였다( $p < 0.025$ ). 또한 24개월에 자일리톨군의 *S. mutans*의 수는 대조군과 비교하였을 때 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).

Table 1. *S. mutans* counts(  $\times 10^5$  CFU/ml) in the control and xylitol groups at baseline, 12, 24 months(mean  $\pm$  SE)

Group	Baseline	12 months	24 months	p-value
Control	36.1 $\pm$ 27.8	1.4 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.9	0.549
Xylitol	34.6 $\pm$ 30.2	0.4 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.2**, ***	0.015*

\* $p < 0.05$  by the Friedman test over time in each group

\*\* $p < 0.025$  by the Bonferroni-corrected Wilcoxon signed-rank test when compared to baseline in each group

\*\*\* $p < 0.05$  by the Mann-Whitney test between the xylitol and control at each time point

3. *S. mutans*의 글루칸 생성과 관련된 유전자의 발현

Table 2는 각 군별 *S. mutans*의 글루칸 생성과 관련된 유전자 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*의 발현을 분석한 결과이다. *gtfB*의 발현은 대조군에서는 시간이 지남에 따라 오히려 유의하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의한 증가를 보였다( $p < 0.025$ ). 반면 자일리톨군에서는 시간이 지남에 따라 *gtfB*의 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 특히 초기에 비해 12개월과 24개월째 모두 통계적으로 유의한 감소를 보였다( $p < 0.025$ ). 또한 12개월과 24개월째 자일리톨군의 *gtfB*의 발현이 대조군과 비교하였을 때 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ). *gtfC*의 발현도 대조군에서는 시간이 지남에 따라 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의한 증가를 보였다( $p < 0.025$ ). 반면 자일리톨군에서는 시간이 지남에 따라 *gtfC*의 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 특히 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의한 감소를 보였다( $p < 0.025$ ). 또한 24개월째 자일리톨군의 *gtfC*의 발현이 대조군과 비교하였을 때 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ). 또한 *gtfD*의 발현은 대조군에서는 시간이 지남에 따라 유의하게 증가하였으며, 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의한 증가를 보였다( $p < 0.025$ ). 반면 자일리톨군에서는 시간이 지남에 따라 *gtfD*의 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 특히 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의한 감소를 보였다( $p < 0.025$ ). 또한 12개월과 24개월째 자일리톨군의 *gtfD*의 발현이 대조군과 비교하였을 때 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).

IV. 총괄 및 고찰

치아우식증은 사람에게서 일어나는 가장 흔한 감염 질병 중 하나로 *S. mutans*는 이러한 치아 우식증을 일으키는 주요 원 인균이다<sup>1)</sup>. 한편 자일리톨은 자연계에 존재하는 5탄당 알코올로 설탕과 같은 정도의 단맛을 가지고 있으면서 치아우식증에 중요한 역할을 하는 *S. mutans*에 의해 대사되지 않기 때문에 치아우식 예방을 위한 설탕대체 감미료로 주목받고 있다<sup>10,16)</sup>. 이전의 많은 연구들은 자일리톨의 섭취가 타액과 치면세균막 내의 *S. mutans* 수의 감소를 초래한다고 보고하였으며<sup>12-15)</sup>, *S.*

*mutans*를 비롯한 *mutans streptococci*의 모자 감염에 영향을 준다는 보고들도 있다<sup>25,26)</sup>. 본 연구에서도 자일리톨검을 섭취하였을 때 시간이 증가함에 따라 타액 내 *S. mutans*의 수가 상당히 감소한 것을 확인하였으며, 특히 24개월에는 초기에 비해 *S. mutans*의 수가 유의하게 감소함을 확인하였다. 물론 대조군에서도 12개월과 24개월에 초기에 비해 *S. mutans*의 수가 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이러한 대조군에서의 *S. mutans* 수의 감소는 연구기간 동안 대상자들에게 구강관리에 대한 교육을 실시한 결과로 사료된다.

한편, Söderling 등<sup>27)</sup>은 장기간의 자일리톨 섭취 이후에 타액 내 *S. mutans*의 숫자는 감소하지 않았고 *S. mutans*의 부착능력이 감소하였다고 보고하였으며, 이 등<sup>28)</sup>도 자일리톨 내성균주와 감성균주의 세포성질을 비교한 연구에서 자일리톨 내성균주가 감성균주보다 자당 의존성 인회석 부착능이 더 낮다고 보고하였다. 이러한 결과는 자일리톨이 *S. mutans* 수의 감소 뿐만 아니라 여러 독성인자들의 억제와도 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 치아 우식과 관련된 *S. mutans*의 중요한 독성인자 중의 하나는 *S. mutans*가 GTFB, GTFC, GTFD와 같은 glucosyltransferase(GTF)효소를 가지고 있어서 자당으로부터 글루칸을 형성한다는 것이다<sup>2,5-7)</sup>. GTFB, GTFC, GTFD는 각각 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* 유전자의 발현에 의해 생성되며, GTFB와 GTFC는 비수용성 글루칸을, GTFD는 수용성 글루칸을 주로 합성한다<sup>6,7)</sup>. 글루칸은  $\alpha$ -1,3 결합과  $\alpha$ -1,6 결합을 가지고 있는데 비수용성 글루칸은 수용성 글루칸 보다  $\alpha$ -1,3 결합을 더 많이 가지고 있어 점착성을 가지며, 세균이 치아표면에 부착하는 것을 도와준다고 알려져 있다<sup>6)</sup>. 박 등<sup>29)</sup>은 우식치아와 정상치아의 교합면에서 분리한 *S. mutans*의 *gtf* 유전자가 서로 다른 양상을 보인다고 보고하였으며, Mattos-Graner 등<sup>30)</sup>과 Napimoga 등<sup>31)</sup>은 치아우식활성이 큰 아이들에서의 *S. mutans*가 그렇지 않은 아이들의 *S. mutans*에 비해 더 많은 글루칸을 합성한다고 보고한바 있다. 또한 Yamashita 등<sup>32)</sup>은 동물 실험을 통하여 GTFB와 GTFC의 활성이 치아우식증을 유발한다고 입증하였다. 이처럼 GTF 효소의 활성은 글루칸 합성을 통해 *S. mutans*의 부착능력을 증가시킴으로써 치아우식증을 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

한편 몇몇 연구들은 자일리톨이 *S. mutans*의 부착능력을 감소시킨다고 보고한 바 있다<sup>27,33)</sup>. 최근 Lee 등<sup>34)</sup>은 자일리톨 섭

Table 2. Relative quantities of glucan synthesis related gene expression of *S. mutans* over time(mean  $\pm$  SE)

	Group	Baseline	12 months	24 months	p-value
<i>gtfB</i>	Control	1.00 $\pm$ 0.00	1.69 $\pm$ 0.33	4.36 $\pm$ 2.00**	0.029*
	Xylitol	1.00 $\pm$ 0.00	0.47 $\pm$ 0.10**, ***	0.27 $\pm$ 0.11**, ***	0.016*
<i>gtfC</i>	Control	1.00 $\pm$ 0.00	1.13 $\pm$ 0.20	6.37 $\pm$ 3.01**	0.009*
	Xylitol	1.00 $\pm$ 0.00	0.55 $\pm$ 0.16	0.32 $\pm$ 0.07**, ***	0.021*
<i>gtfD</i>	Control	1.00 $\pm$ 0.00	1.34 $\pm$ 0.28	4.43 $\pm$ 2.14**	0.003*
	Xylitol	1.00 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.17***	0.55 $\pm$ 0.11**, ***	0.003*

\* $p < 0.05$  by the Friedman test over time in each group

\*\* $p < 0.025$  by the Bonferroni-corrected Wilcoxon signed-rank test when compared to baseline in each group

\*\*\* $p < 0.05$  by the Mann-Whitney test between the xylitol and control at each time point

취가 *gtfB*의 감소를 야기함으로써 결과적으로 *S. mutans* 집락의 크기를 줄일 뿐 아니라 extracellular polysaccharides (ECP)의 합성을 감소시켜 형태적 변화를 야기한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 자일리톨검 섭취에 따른 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* 유전자의 발현의 차이를 실시간 중합연쇄반응을 사용하여 평가해본 결과, 자일리톨검을 24개월 동안 장기적으로 섭취하였을 때 그렇지 않은 대조군에 비해 글루칸 합성과 관련된 유전자들의 발현이 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 특히 *gtfB*와 *gtfD*는 자일리톨검 섭취 12개월째에서도 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는 자일리톨이 *S. mutans*의 글루칸 형성을 억제시킨다는 것을 시사하고 있으며, *in vitro*에서 자일리톨에 의한 *gtf* 유전자들의 억제력을 보고하였던 염 등<sup>22)</sup>의 보고와 일치한다. 이상의 결과를 종합해볼 때, 장기적인 자일리톨 섭취는 구강 내 *S. mutans*의 글루칸 합성 관련 유전자들의 발현을 억제시킴으로써 독력을 감소시켜 *S. mutans*의 수적인 감소를 가져오게 되고, 결과적으로 치아우식증 예방에 효과적인 것으로 사료된다.

본 연구의 제한점은 연구대상자들의 수가 비교적 적어서 대상자의 순응도에 따라 그 결과가 의존적일 수 있으며, 대상자의 수가 제한되므로 도출된 결과를 일반화하는데 다소 제약이 따른다는 점을 들 수 있다. 그리고 장기간의 연구 특성상 대상자들의 순응도 등의 문제로 인해 대조군에 무설탕검을 씹도록 하지 못하여서, 검 저작에 의한 효과를 동일하게 control하지 못하였다는 제한점이 있다. 그렇지만 본 연구에서는 모든 대상자들에 대하여 잇솔질 교육을 비롯한 기타 구강보건교육 등을 통하여 이러한 제한점을 최소화하기 위하여 노력하였다. 다음으로 자일리톨검을 섭취하지 않은 대조군에서는 글루칸 합성 관련 유전자들의 발현이 유의하게 증가함을 보였다. 이러한 결과는 타액 샘플을 채취한 시기가 초기에 비하여 최대 24개월까지 차이가 나기 때문으로 사료된다. 그럼에도 불구하고, 본 연구에서는 각 시기에 있어서 두군의 타액 채취일의 차이는 2주 이내로 유사하였고, 대조군에 비하여 자일리톨검군의 *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* 발현이 초기에 비해 24개월째 통계적으로 유의하게 감소한 것은 자일리톨의 효과를 입증하는 결과로써 충분하다 하겠다. 또한 본 연구는 실험실 균주를 사용한 기존의 연구에서 탈피하여 실제 구강 내에 존재하는 *S. mutans*를 분리하여 분석함으로써 자일리톨에 의한 구강의 실질적인 영향을 평가했다는 점에서 의의가 있다고 하겠다. 따라서 향후 이러한 제한점들을 보완하여 포괄적이고 심층적인 연구가 진행되어야 하겠으며, 글루칸 합성과 관련된 유전자의 발현 뿐만 아니라 실제로 합성되는 글루칸의 양을 정량적 및 정성적으로 평가하여 비교하는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### V. 결 론

본 연구에서는 장기적인 자일리톨의 섭취가 *S. mutans*의 대표적인 독성인자 중 하나인 글루칸 생성에 미치는 영향을 유전

자 수준에서 알아보기 위하여 글루칸 합성효소인 GTF의 mRNA 발현을 실시간 중합연쇄반응을 통해 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 24개월 동안 자일리톨검을 섭취한 군에서 타액 내 *S. mutans*의 colony 수는 통계적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).
2. 비수용성 글루칸 합성에 관여하는 유전자인 *gtfB*, *gtfC*의 발현은 자일리톨검을 섭취한 군에서 시간이 지남에 따라 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 특히 *gtfB*의 발현은 12개월과 24개월째 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았고, *gtfC*의 발현은 24개월째 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).
3. 수용성 글루칸 합성에 관여하는 유전자인 *gtfD*의 발현 역시 자일리톨검을 섭취 군에서 시간이 지남에 따라 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 *gtfD*의 발현은 12개월과 24개월째 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ).

이상의 결과들을 종합해 보았을 때, 24개월 동안 장기적인 자일리톨 섭취는 구강 내 *S. mutans*의 글루칸 합성 관련 유전자들의 발현을 억제시킴으로써 *S. mutans*의 수적인 감소를 가져오게 되고, 결과적으로 치아우식증 예방에 효과적인 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Hamada S, Slade HD : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev, 44:331-384, 1980.
2. Kuramitsu HK : Virulence factors of mutans streptococci : Role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med, 4: 159-176, 1993.
3. Rolla G, Scheie AA, Ciardi JE : Role of sucrose in plaque formation. Scand J Dent Res, 93:105-111, 1985.
4. Shemesh M, Tam A, Feldman M, et al. : Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. Carbohydrate Research, 341:2090-2097, 2006.
5. Dibdin GH, Shellis RP : Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. J Dent Res, 67:890-895, 1988.
6. Vacca-Smith AM, Bowen WH : Binding properties of streptococcal glucosyltransferase for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. Arch Oral Biol, 43:103-110, 1998.

7. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, et al. : Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. J Dent Res, 80:1672-1677, 2001.
8. Zucca M, Cenna S, Berzioli S, et al. : *Streptococcus mutans* and dental caries : microbiological aspects. G Bacteriol Virol Immunol, 83:108-117, 1990.
9. Napimoga MH, Höfling JF, Kleing MI, et al. : Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Sci, 47:59-64, 2005.
10. Scheinin A, Mäkinen KK : Turku sugar studies : an overview. Acta Odontol Scand, 34:405-408, 1976.
11. 한성근, 최연희, 손은영 등 : 자일리톨 껌 저작에 의한 유치 우식증 예방효과 비교분석. 대한소아치과학회지, 31:159-168, 2004.
12. Mäkinen KK, Alanen P, Isokangas P, et al. : Thirty-nine-month xylitol chewing-gum programme in initially 8-year-old school children : a feasibility study focusing on mutans streptococci and lactobacilli. Int Dent J, 58:41-50, 2008.
13. Thaweboon S, Thaweboon B, Soo-Ampon S : The effect of xylitol chewing gum on mutans streptococci in saliva and dental plaque. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 35:1024-1027, 2004.
14. Mäkinen KK, Isotupa KP, Kivilompolo T, et al. : Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutans streptococci. Caries Res, 35:129-135, 2001.
15. Holgerson PL, Sjöström I, Steckén-Blicks C, et al. : Dental plaque formation and salivary mutans streptococci in schoolchildren after use of xylitol-containing chewing gum. Int J Paediatr Dent, 17:79-85, 2007.
16. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, et al. : Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. Caries Res, 19:53-63, 1985.
17. Gauthier L, Vadeboncoeur C, Mayrand D : Loss of sensitivity to xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. Caries Res, 18:289-295, 1984.
18. Trahan L, Mouton C : Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. J Dent Res, 66:982-988, 1987.
19. Dréan MF, Trahan L : A new method for the detection and enumeration of xylitol-resistant (fructose-PTS-) strains of *Streptococcus mutans* from pure cultures and human saliva. Microbial Ecol Hlth Dis, 3:113-120, 1990.
20. Trahan L, Söderling E, Dréan MF, et al : Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol-resistant strains. J Dent Res, 71:1785-1791, 1992.
21. Trahan L : Xylitol : a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. Int Dent J, 45:77-92, 1995.
22. 임정현, 정진, 정태성 등 : *gtf* 유전자 발현에 대한 xylitol의 영향. 대한소아치과학회지, 31:304-310, 2004.
23. Nascimento MM, Höfling JF, Goncalves RB : *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res, 38:454-463, 2004.
24. Shemesh M, Tam A, Steinberg D : Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. Microbiology, 153:1307-1317, 2007.
25. Thorild I, Lindau B, Twetman S : Salivary mutans streptococci and dental caries in three-year-old children after maternal exposure to chewing gums containing combinations of xylitol, sorbitol, chlorhexidine, and fluoride. Acta Odontol Scand, 62:245-250, 2004.
26. Söderling E, Isokangas P, Pienihäkkinen K, et al. : Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants. J Dent Res, 79:882-887, 2000.
27. Söderling E, Alaräisänen L, Scheinin A, et al. : Effect of xylitol and sorbitol on the polysaccharide production and adhesive properties of *Streptococcus mutans*. Caries Res, 21:109-116, 1987.
28. 이홍모, 김정욱, 장기택 등 : Xylitol-resistant *Streptococcus mutans*와 xylitol-sensitive *Streptococcus mutans*의 세포 성질에 관한 비교연구. 대한소아치과학회지, 30:554-558, 2003.
29. 박호원, 정태성, 정진 등 : 우식치아와 정상치아의 교합면에서 분리한 *Streptococcus mutans*의 비교. 대한소아치과학회지, 28:129-141, 2001.
30. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, et al. : Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res, 79:1371-1377, 2000.
31. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, et al. : Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol, 53:697-703, 2004.

32. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, et al. : Role of the *Streptococcus mutans gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun*, 61:3811-3817, 1993.
33. Trahan L, Bourgeau G, Breton R : Emergence of multiple xylitol-resistant(fructose PTS-) mutants from human isolates of mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. *J Dent Res*, 75:1892-900, 1996.
34. Lee YE, Choi YH, Jeong SH, et al. : Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. *Curr Microbiol*, 58:332-337, 2009.

Abstract

INHIBITION OF GLUCAN SYNTHESIS RELATED GENE EXPRESSION OF  
*STREPTOCOCCUS MUTANS* BY XYLITOL TREATMENT

Ji-Hye Kim, Young-Eun Lee, Sang-Hun Ahn\*, Youn-Hee Choi, Soon-Heyun Nam\*\*, Keun-Bae Song

*Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University*

*\*Department of Dentistry, College of Medicine, Dongguk University*

*\*\*Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University*

Xylitol has the ability to reduce the adherence of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), which can make it easier to remove plaque, decrease acid production and inhibit dental caries. There are few reports on the effects of xylitol on the expression of the virulence related genes in *S. mutans*. This study examined the inhibitory effect of chewing gum containing xylitol on glucan synthesis related gene expression of *S. mutans*. Participants were voluntarily recruited for a women's oral health prevention program, classified into two groups (a control and a xylitol group), and then followed for 2 years. Twenty salivary samples were randomly selected from each group. Colony count and real-time reverse transcription polymerase chain reaction were used to analyze the characteristics of *S. mutans*. The following results were obtained:

The *S. mutans* counts decreased steadily in the xylitol group over the study period ( $p < 0.05$ ). The expression of the virulence related genes (*gtfB*, *gtfC* and *gtfD*) was significantly lower in the xylitol group than in the control groups ( $p < 0.05$ ). In conclusion, these results suggest that chewing xylitol gum for a long period of time may reduce the expression of the genes associated with *S. mutans* virulence, which can result in a decrease growth of *S. mutans* colonies as a result.

**Key words** : Glucan synthesis related gene, *Streptococcus mutans*, Xylitol