

백두옹 추출물이 *Streptococcus mutans*의 비수용성 글루칸형성 및 부착억제에 미치는 영향

김강주 · 박복임¹ · 민재홍¹ · 채민석¹ · 임재유¹ · 손혁진¹ · 이기훈¹ · 안소연² · 전병훈³ · 최나영⁴ · 유용옥^{1*}

원광대학교 치과대학 구강미생물학교실, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실, 2: 원광대학교 치과대학 소아치과학교실, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 4: 원광대학교 사범대학 가정교육과

Inhibitory Effects of *Radix Pulsatillae* Extract on Insoluble Glucan Synthesis and Adhesion of *Streptococcus mutans*

Kang Ju Kim, Bog Im Park¹, Jae Hong Min¹, Min Suk Chae¹, Jae You Lim¹, Hyeok Jin Son¹, Gi Hoon Lee¹, So Youn An², Byung Hun Jeon³, Na Young Choi⁴, Yong Ouk You^{1*}

Department of Oral Microbiology, 1: Department of Oral Biochemistry, 2: Department of Pediatric dentistry, School of Dentistry, 3: Department of Pathology, College of Korean Medicine, 4: Department of Home Economics Education of Wonkwang University

Streptococcus mutans plays a vital role in triggering dental caries establishment due to its ability to synthesize two significant factors. The two factors are organic acids and glucans. The former demineralized dental enamel and the latter mediates the attachment of bacteria to tooth surface. It is believed that demineralization of dental enamel and attachment of bacteria are the crucial events that indicate and develop dental caries. For this reason, we studied the effect of the ethanol extracts of *Radix Pulsatillae* on the growth and acid production of *S. mutans*. Ethanol extracts of the *Radix Pulsatillae* showed concentration dependent inhibitory activity against the growth and acid production of *S. mutans*, and produced significant inhibition compared to the control groups ($p < 0.05$). The extracts inhibited *S. mutans* adherence to hydroxyapatite treated with saliva, and cell adherence was repressed by *Radix Pulsatillae*. the ethanol extract of *Radix Pulsatillae* showed remarkable inhibition of glucosyltransferase, which synthesizes water insoluble glucan form sucrose. Phytochemical analysis showed *Radix Pulsatillae* contained major components such as phenolic compounds, glycosides, steroids, terpenoid, and saponin. These results suggest that *Radix Pulsatillae* may have anti-cariogenic properties, which may be related with major components such as phenolic compounds, glycosides, steroids, terpenoid, and saponin.

keywords : *Radix Pulsatillae*, Dental caries, *Streptococcus mutans*, Bacteria, Glucan, Adhesion

서 론

국민건강보험공단이 발행한 2014년 건강보험통계연보에 의하면 질병소분류별 다빈도 상병에 치은염 및 치주질환(2위), 치아우식(7위), 치수 및 치근단주위조직의 질환(13위)등이 최상위 질환에 포함돼 있고, 같은 해 건강보험 외래요양급여비용 10대 질환에도 이들 질환들이 포함돼 있다.¹⁾ 이들 질환은 모두 치면세균막에 의하여 발생하는 질병으로 현대인의 '삶의 질 향상'을 실현시키기 위해서는 반드시 예방 및 치료가 필요하다. 치아우식증은 세계적으로 가장 흔한 만성질환으로, 당분이나 탄수화물이 많이 포함하고 있는 음식을 섭취하면 구강세균이 치면세균막을 형성하고 이들 세균이

당분을 대사하여 유기산을 형성하고, 세균에서 분비된 유기산은 치아를 용해시켜 법랑질에서부터 치수까지 점진적으로 손상을 일으켜 치아를 잃게 하는 세균성질환이다.²⁾ 치아우식증이 발생되면 치아의 손상된 부분이 완전히 재생되지 않으므로 치아우식증의 원인이 되는 치면세균막의 관리가 가장 중요하다. 치면세균막의 관리를 위해서 효과적인 양치법과 같은 기계적방법과 화학적 보조제를 사용하는 방법 등이 이용되고 있다.³⁻⁵⁾

건강한 사람의 구강에는 600여종의 서로 다른 미생물들이 살고 있으며 1 ml의 타액에 1억 개의 세균이 존재하는 것으로 알려져 있고, 초기 치아우식증이 있는 치아에서 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)와 *Streptococcus sobrinus* 2종이 각각

* Corresponding author

Yong Ouk You, Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr · Tel : +82-63-850-6926

Received : 2015/11/12 · Revised : 2015/12/15 · Accepted : 2015/12/17

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.02.30.1.27>

Available online at <http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm>

80%와 20% 수준으로 분리되었다고 보고된 바 있다.⁶⁾ *S. mutans*는 초기우식에 관여하고 Glucosyltransferase (GTFase)를 분비하여 글루칸과 같은 세포외 다당류를 형성한다.⁷⁾ 글루칸은 치아에 세균을 견고하게 부착할 수 있도록 도와주어, 저작 등의 물리적인 힘에 의해 부착된 세균이 떨어지는 것을 막아준다. 또한 *S. mutans*의 fructosyltransferase (FTFase)는 fructan을 합성에 기여하여 치면세균막 형성에 관여하는 것으로 보고되어 있다.^{8,9)} 따라서 GTFase와 FTFase는 sucrose를 기질로 이용하여 치면세균막의 기질을 형성하고, 치면세균막 형성에 있어 중요한 역할을 담당한다. *S. mutans*는 glucose 또는 sucrose를 이용하여 글리코겐과 비슷한 화학적구조를 갖는 세균의 세포내다당류를 만들어 에너지를 축적한다. 세균의 세포내다당류는 탄수화물 섭취가 없을 때 구강세균이 에너지원으로 대사하여 에너지를 얻어내고 대사산물로 유기산을 생성한다.¹⁰⁻¹⁵⁾ 이들 유기산은 치아를 구성하는 hydroxyapatite 같은 인산칼슘화합물을 분해하여 치아우식증을 유발하게 된다.

구강내에서 치아우식증을 억제해주는 효과가 있는 천연 추출물로는 현재까지 녹차¹⁶⁻¹⁸⁾, propolis¹⁹⁾, 으름덩굴^{20,21)}, 후박^{22,23)}, Xylitol²⁴⁾ 등 여러 천연 추출물이 보고된 바 있다. 천연 물은 치아우식증 유발균에 대한 항균력이 우수하면서도 인체 및 환경 독성이 낮아 좋은 치아우식증 억제물질 개발의 소재가 되고 있다. 생약제재 중에서 백두옹(白頭翁, *Radix Pulsatillae Nakai et Mor*)은 미나리제재과(*ranunculaceae*)에 속하는 다년초 초본식물로서 우리나라의 전 지역에 분포하고 있으며 중국 동북부에도 자생하고 있다. 꽃은 4-5월에 적자색으로 피는데 여러 개의 꽃대 끝에 꽃이 하나씩 달린다. 줄기와 잎 그리고 꽃은 흰색 잔털이 덮여 있으며 우리나라에서는 일명 “할미꽃”으로 불린다. 이 생약은 『神農本草經』 下品에 나와 있으며, 치통, 해열 및 수종 등에 효과가 있고, 항균, 소염, 수렴, 지혈, 이질, 청열해독, 음낭대하, 진정 및 항암 등에도 이용되어 왔다.²⁵⁻²⁹⁾ 백두옹에 성분 중 saponin은 소염작용이 있는데 가수분해 되어 triterpene형의 genin과 glucose 등으로 전환되는 것으로 알려졌다.^{30,31)} 백두옹 추출물은 예로부터 민간요법으로 사용되었던 치아우식 예방효과를 관찰하여 임상에 적용할 수 있는 약제효능, 효과를 나타낼 수 있는 생약제재로 개발한다면 안전하고 경제적인 가치가 있으며, 건강증진을 통한 ‘삶의 질 향상’이라는 목표달성에 큰 기여를 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 백두옹을 에탄올로 추출하여 *S. mutans*의 성장과 산 생성, biofilm 형성 억제, saliva-coated hydroxyapatite bead(S-HA)에 부착 억제, GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 효과를 연구하여 우식활성억제에 미치는 영향을 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구재료

1) 백두옹 추출물 준비

백두옹은 원광대학교 대학약국에서 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 건조하여 세절한 백두옹 0.5 kg을 에탄올 1 L로 상온에서 3일간 2회 추출하여 에탄올 추출물을 59.37 g (1.98%)을 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 산생성 억제 실험

1%의 glucose가 들어 있는 BHI 액체배지에 백두옹 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 백두옹추출물을 넣지 않고 시행하였다.

2) 타액준비

타액은 건강한 성인 남자로부터 파라핀왁스로 자극하여 분비된 것을 냉각된 비커에 채취한 다음, 채취된 타액은 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 15분)하여 상청액을 취한 다음, 분해효소를 불활성화 시키기 위하여 60°C에서 30분간 처리한 후, -20°C에 보관하면서 사용하였다.

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 백두옹의 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, AMPLITUDE 30, PULSE 3)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 48시간 동안 배양시켜 집락수를 세었다. 대조군은 백두옹 추출물을 넣지 않고 시행하였다.

4) Glycosyltransferase (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 4시간마다 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 M 자당용액, 0.25 ml의 각 농도별 백두옹 에탄올 추출물을 넣고, GTFase를 넣어 최종 1 ml이 되게 하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 증류수로 세척한 후 비수용성 글

루칸을 떼어내기 위하여 초음파장치 (40W, 4초)를 이용하였다. 그 후 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.

6) 정성 실험

Mayer 시약으로 alkaloid를, Ferric chloride 시약으로 phenolics를, Molish 시험 방법으로 glycosides를, Biuret 시약으로 peptide를, Mg-HCl시약으로 flavonoid를, Liebermann-Burchard 시약으로 steroid, terpenoid, saponin을, silver nitrate 시약으로 Organic acid를 검출한다.

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

결 과

1. 백두옹 에탄올 추출물의 *S. mutans* 성장억제에 미치는 효과

백두옹 에탄올 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위하여 BHI 액체배지에 백두옹의 에탄올 추출물을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 첨가한 후, *S. mutans*를 접종하여 37°C 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 백두옹 추출물을 넣지 않은 대조군에서 0.271 ± 0.023 흡광도를 나타내었다. 그런데, 0.0625 mg/ml 농도에서 에탄올 추출물은 0.242 ± 0.010 흡광도를 나타내고, 0.125 mg/ml 농도에서는 0.222 ± 0.006 , 0.25 mg/ml 농도에서는 0.146 ± 0.015 , 0.5 mg/ml 에서는 0.052 ± 0.014 , 1 mg/ml 농도에서는 0.031 ± 0.025 흡광도를 나타내었다. 백두옹 에탄올 추출물을 첨가한 실험군의 O.D 값은 대조군의 O.D 값에 비해 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 낮아져 성장 억제 효과를 보였으며, 실험군은 각각의 농도에서 대조군에 비하여 각각 10.8%, 18.3%, 46.1%, 80.8%, 88.7%의 성장억제효과를 보였다.

2. 백두옹 에탄올 추출물의 *S. mutans* 산 생성 억제에 미치는 효과

백두옹 에탄올 추출물 첨가에 따른 *S. mutans*에 의한 유기산 생성 억제 효과를 알아보기 위해 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도의 시료에 *S. mutans*를 접종하여 24시간 배양 후에 pH meter로 pH를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 백두옹 추출물을 넣지 않은 대조군에서 pH는 5.20 ± 0.100 를 나타내었다. 백두옹 추출물은 0.0625 mg/ml 농도에서 5.43 ± 0.115 , 0.125 mg/ml 농도에서는 5.53 ± 0.115 , 0.25 mg/ml 농도에서는 5.60 ± 0.265 , 0.5 mg/ml 농도에서는 7.00 ± 0.200 , 1 mg/ml 농도에서는 7.15 ± 0.050 를 나타내었다. 백두옹의 에탄올 추출물의 pH값은 대조군의 pH 값에 비해 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 높아졌

으며 ($p < 0.05$), 특히 0.5 mg/ml 농도 이상에서는 임계 pH (pH 5.5 - 5.6) 이상을 나타냈다.

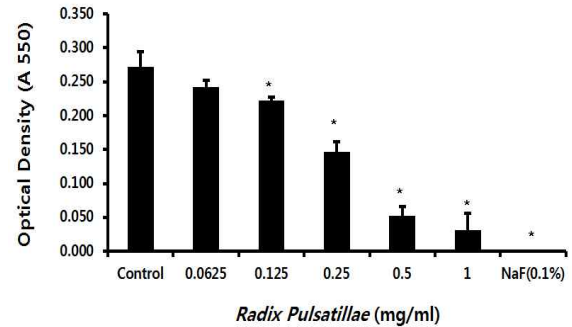


Fig. 1. Effect of ethanol extract of *R. pulsatillae* on the growth of *S. mutans*. *S. mutans* was inoculated into BHI broth with various concentrations of *R. pulsatillae*, and incubated for 24 h at 37°C. The optical density (A550) was read using a spectrophotometer. Data are mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared to the control group.

Table 1. The pH of *S. mutans* by the various concentrations of ethanol extract of *R. Pulsatillae*

Conc.(mg/ml)	pH(before incubation)	pH(after incubation)
Control	7.17 \pm 0.11	5.20 \pm 0.10 ¹⁾
0.0625	7.20 \pm 0.00	5.43 \pm 0.11
0.125	7.20 \pm 0.00	5.53 \pm 0.11*
0.25	7.17 \pm 0.11	5.60 \pm 0.26*
0.5	7.20 \pm 0.08	7.00 \pm 0.20*
1	7.22 \pm 0.05	7.15 \pm 0.05*
0.1% NaF	7.11 \pm 0.00	7.10 \pm 0.00*

Data(pH) are represented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$ when compared with the control group after incubation. 1) Value represent the Mean \pm 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.

3. 백두옹 에탄올 추출물의 S-HA 부착 억제에 미치는 효과

백두옹 에탄올 추출물이 S-HA에 *S. mutans* 부착 억제 효과가 있는지 알아본 결과 Fig. 2와 같다. 대조군은 $143 \pm 9.81 (\times 10^3)$ CFU/ml이었으며, 에탄올 추출물 0.0625 mg/ml 농도에서는 $123 \pm 6.38 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.125 mg/ml 농도에서는 $112 \pm 9.20 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.25 mg/ml 농도에서는 $104 \pm 13.37 (\times 10^3)$ CFU/ml, 0.5 mg/ml 농도에서는 $95 \pm 16.77 (\times 10^3)$ CFU/ml, 1 mg/ml 농도에서는 $37 \pm 2.55 (\times 10^3)$ CFU/ml로 0.125 mg/ml 이상 농도에서 대조군에 비하여 S-HA에 부착하는 균수가 유의한 차이를 보이며 감소하였으며 ($p < 0.05$), 농도별로 대조군에 비해 각각 14%, 22%, 27%, 34%, 74%의 부착 억제율을 보였다.

4. 백두옹 에탄올 추출물의 GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제에 미치는 효과

백두옹 추출물이 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있는지 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. 에탄올 추출물은 대조군에 비해 0.0625, 0.125, 0.025, 0.5, 1 mg/ml 각각의 농도에서 $91.7 \pm 5.15\%$, $83.3 \pm 7.56\%$, $77.1 \pm 4.35\%$, $48.3 \pm 4.53\%$, $23.5 \pm 4.19\%$ 의 생성율을 보여, 백두옹 에탄올 추출물이 GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 즉, 실험군은 대조군과 비

교해 봤을때 각각의 농도에서 8.3%, 16.7%, 22.9%, 51.7%, 76.5%의 비수용성 글루칸 합성 억제율을 보였다. 백두옹 에탄올 추출물의 GTFase에 의한 비수용성 글루칸 합성 억제 효과는 0.25 mg/ml 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 높아졌다 ($p < 0.05$).

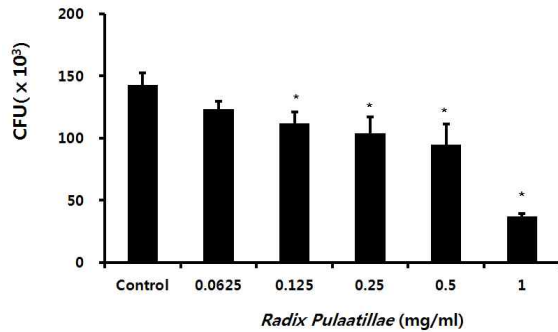


Fig. 2. Effect of *R. pulsatillae* on *Streptococcus mutans* growth and adherence to saliva coated hydroxyapatite beads. The bacteria was inoculated into BHI broth with various concentration of *R. pulsatillae* and cultured for 24 h at 37 °C. Inhibitory activity is shown in the presence of *R. pulsatillae* at concentrations ranging from 0.0625-1mg/mL. Each value is expressed as a mean \pm standard deviation. Significance was determined at * $p < 0.05$ when compared with the control.

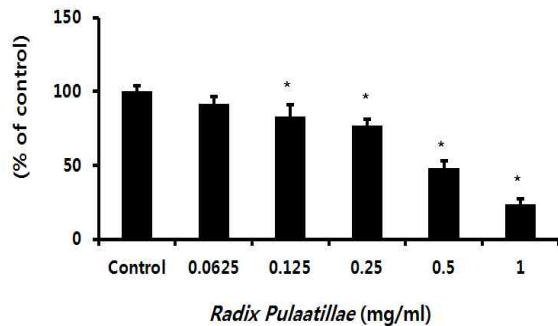


Fig. 3. Rate of insoluble glucan synthesis of *S. mutans* by the various concentration of ethanol extract of *R. pulsatillae*. * $p < 0.05$ was statistically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

5. 백두옹 에탄올 추출물의 정성 실험

백두옹 에탄올 추출물을 정성 실험 한 결과, phenolic compounds와 glycosides는 강한 양성반응이 나타났고, steroids, terpenoid, saponin은 중간정도의 양성반응을 보였다. 그리고 peptides와 flavonoids는 약한 양성반응을 보였다. 또한 organic acids는 침전물을 생성하였다.³²⁾

Table 2. phytochemical analysis of *R. pulsatillae*

Plant constituents	Ethanol extract
Alkaloids	-
Phenoic compounds	+++
Glycosides	+++
Peptides	+
Flavonoids	+
Steroids, Terpenoids	++
Organic acids	+

+++ strong, ++ medium, + poor presence, - absence

고 찰

치아우식증은 대표적인 만성질환으로서 이를 예방하려는 노력은 과거부터 지속되어 왔다. 치아우식증은 과거에 비하여 발생빈도는 다소 감소하는 추세를 보이거나 아직도 가장 많이 발생하는 질환의 하나로서 특히 치아우식증을 유발하는 가장 중요한 원인균은 산생성능과 치면부착성이 뛰어난 *S. mutans*이다. 치면세균막내 미생물은 당질을 대사하여 유기산을 형성함으로 치아의 경조직을 파괴하고, 미생물에 대한 인체의 염증반응은 치주병을 유발하는 것으로 보고된다.³³⁾

이에 본 연구에서는 백두옹을 에탄올로 추출한 후 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도별 시료를 사용하여 *S. mutans*에 대한 성장억제효과를 관찰한 결과 *S. mutans*의 성장률이 대조군에 비하여 에탄올 추출물 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1mg/ml 농도에서 각기 10.8%, 18.3%, 46.1%, 80.8%, 88.7%의 성장억제 효과를 나타내었다. 또한 백두옹 에탄올 추출물을 넣지 않은 대조군에서 pH는 5.20 ± 0.100 을 나타내었지만, 백두옹 에탄올 추출물 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도에서, 각각 5.20 ± 0.100 , 5.43 ± 0.115 , 5.53 ± 0.115 , 5.60 ± 0.265 , 7.00 ± 0.200 , 7.15 ± 0.050 의 값으로서, 0.5 mg/ml 농도이상에서는 치아우식증에서 무기질 탈회가 일어나는 임계 pH이상을 나타냈다. 백두옹의 농도가 증가함에 따라 pH가 증가하는 것으로 보아 백두옹 에탄올 추출물이 *S. mutans*에 의한 유기산 생성을 억제하여 치아우식증에 효과를 나타낼 수 있음을 의미한다. 백두옹에는 linoleic acid 같은 항균 활성을 보이는 성분이 있는 것으로 알려져 있는데,³⁴⁾ 백두옹의 *S. mutans*에 대한 항균작용 및 산 생성억제는 이런 성분의 영향에 의한 것일 것으로 추정된다.

백두옹이 S-HA에 *S. mutans* 부착 억제 효과가 있는지 알아본 결과, 농도 의존적으로 S-HA에 부착한 균수가 적어졌다. 1 mg/ml의 농도에서 효과가 탁월하여 74%의 억제율을 보였다. GTFase에 의한 불용성 글루칸 형성을 백두옹이 억제하는지 탐구해본 결과 백두옹 에탄올 추출물을 0.625, 0.125, 0.25, 0.5, 1mg/ml 농도로 첨가한 실험군은 대조군에 비해 각각 $91.7 \pm 5.15\%$, $83.3 \pm 7.56\%$, $77.1 \pm 4.35\%$, $48.3 \pm 4.53\%$, $23.5 \pm 4.19\%$ 의 글루칸 생성율을 보였다. 즉, 실험군은 대조군과 비교해 봤을 때 각각의 농도에서 8.3%, 16.7%, 22.9%, 51.7%, 76.5%의 비수용성 글루칸 합성 억제율을 보였다. 이러한 결과를 고찰해보면 백두옹 추출물의 농도를 증가시킬수록 글루칸 합성을 억제한다는 사실을 알 수 있고 따라서 백두옹은 불용성 글루칸 형성을 억제한다고 할 수 있다. 구강세균은 치면세균막 기질로 Glucosyltransferase (GTFase) 작용에 의하여 불용성인 glucan을 합성하는데, 이는 치면세균막을 매우 견고하게 만들고, 구강세균의 부착을 촉진시켜 치면세균막의 발달을 더욱 가속화시킨다. 부착된 glucan에서 *S. mutans* 등의 구강세균이 유기산을 생성하며 이들은 치아의 법랑질을 탈회하여 치아우식증을 유발하게 된다.²⁾

백두옹 에탄올 추출물을 정성실험 한 결과 phenolic compounds와 glycosides가 많은 함량으로 포함된 것을 보였고, steroids, terpenoid, saponin도 중간정도로 존재하는 것으로 보였

다. 문헌고찰 결과 백두옹에 함유되어 있는 약리성분들은 saponin, 11-hoxadecanoic acid, 14-methylpentadecanoic acid, 1,2-benzenedicarboxylic acid, protoanemonin, 및 anemonin을 함유하고 있는데, 이중 saponin은 소염작용을 갖고 있고 가수분해되어 triterpen형의 genin, glucose 등으로 전환되는 것으로 알려졌다.^{30,31)} 그리고 백두옹에서 분리된 성분인 linoleic acid의 항균 작용 및 항진균 활성에 대해서도 일부 보고된 바가 있다.³⁴⁾ 위 문헌고찰을 바탕으로 백두옹 에탄올 추출물의 성분 중 *S. mutans*의 성장억제효과를 보이는 성분은 linoleic acid에 의한 것으로 추정된다. 그러나 백두옹의 성분 중 어느 것이 어떠한 기전을 통해 *S. mutans*의 성장과 산 생성을 억제하는지에 관하여 명확히 규명하는 것은 추후에 추가적인 연구가 필요할 것이다.

이상의 결과를 토대로 하여 볼 때, 결론적으로 백두옹 에탄올 추출물은 *S. mutans*의 성장 억제, 유기산의 생성 억제, S-HA에 *S. mutans* 부착 억제, GTFase에 의한 불용성 글루칸 합성 억제에 효과가 관찰되며, 이러한 효과는 백두옹에 포함되어 있는 phenolic compounds, glycosides 등에 의한 것으로 생각되어진다.

결 론

치아우식 예방에 효과적인 예방제를 개발하기 위해 천연물 백두옹을 에탄올로 추출하여 *S. mutans*의 성장과 산 생성 억제 효과, S-HA에 대한 부착 억제 효과와 비수용성 글루칸 합성 억제를 측정하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

*S. mutans*의 성장억제율이 백두옹 에탄올 추출물을 넣지 않은 대조군에 비하여 백두옹 에탄올 추출물은 0.0625, 0.125 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도에서 각각 10.8%, 18.3%, 46.1%, 80.8%, 88.7%로 1mg/ml이상의 농도에서 대조군과 유의한 차이를 보여 *S. mutans* 성장억제 효과를 유의적으로 나타내었다. ($p < 0.05$)

*S. mutans*의 산 생성량은 대조군에서 pH 7.17±0.10이었고 백두옹 에탄올 추출물은 0.0625, 0.125 0.25, 0.5, 1 mg/ml 첨가군에서, 각각 5.20±0.10, 5.43±0.11, 5.53±0.11, 5.60±0.26로 특히 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 우식 임계 pH 5.5보다 높아 산 생성 억제 효과를 보였다. ($p < 0.05$)

S-HA에 *S. mutans*의 부착율이 백두옹의 에탄올 추출물 0.0625, 0.125 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도에서 대조군에 비하여 각각 14%, 22%, 27%, 34%, 74%의 부착억제율을 보여 1 mg/ml이상의 농도에서 음성대조군과 유의한 차이를 보였다. ($p < 0.05$)

GTFase에 의한 비수용성 글루칸 정량 실험을 한 결과 대조군에 비해 0.0625, 0.125 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도에서 각각 1.7±5.15%, 83.3±7.56%, 77.1±4.35 %, 48.3±4.53%, 23.5±4.19%로 농도 의존적으로 유의한 차이를 보이며 낮아졌으며 즉, 각각의 농도에서 8.3%, 16.7%, 22.9%, 51.7%, 76.5%의 비수용성 글루칸 합성 억제율을 보였다. ($p < 0.05$)

정성실험을 통해 백두옹 에탄올 추출물의 성분을 검사한 결과, 백두옹에는 phenolic compounds, glycosides, steroids, terphenoids, peptides, flavonoids 및 organic acids가 포함된 것으로 추정되며, alkaloids는 포함되지 않은 것으로 나타났다. 그

중 phenolic compounds와 glycosides의 반응이 비교적 현저한 것으로 보아 상당량이 포함되어있다고 볼 수 있다.

백두옹을 에탄올로 추출하여 항치아우식활성을 알아본 결과 백두옹의 에탄올 추출물이 *S. mutans*의 성장억제, 유기산의 생성 억제, S-HA에 대한 부착 억제, 비수용성 글루칸 합성 억제에 효과가 있어, 항치아우식 예방제로서의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 본 연구결과를 토대로 백두옹 추출물이 비교적 광범위하면서도 높은 항균성을 가지고 있는 것으로 판단되며 향후 단계적으로 물질을 분리 동정하여 독성이나 구강의 다른 세포 또는 조직에 대한 영향에 어떤 효과를 나타내는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행 됨.

References

1. Categorical data by Frequent sickness(Total), National Health Insurance Statistical Yearbook. Table VI-3, 2015.
2. Miller, W.D. New Theories concerning Decay of Tecth, D. Cosmos. 47(1):293, 1905.
3. Lindhe, J., Koch, G. The effect of supervised oral hygiene on gingivae of children. Lack of prolonged effect of supervision. J Periodont Res. 2: 215, 1967.
4. Khocht, A., Spindel, L., Person, P. A Comparative Clinical Study of the Safety and Efficacy of Three Toothbrushes. J. Periodontol. 63: 603, 1992.
5. Julia, D., Hooper, S.J., Wilson, M.J., Wade, W.G. *Prevotella histicola* sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 58(8):1788-1791, 2008.
6. Yoo, Y.K., Ro, J.S., Kim, J.S., Chang, K.W. The Antibacterial Effects of Some Propolis Constituents against *S. mutans*, *Lactobacilli* and *Actinomyces*. J Korea Acad Oral Health. 20(1):65-74, 1996.
7. Johnson, J.R., Gjerme, P., Eriksen, H. Effect of 2 years use of chlorhexidine-containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. Scand J dent Res. 83: 288-292, 1967.
8. Bammann, L.L., Gibbons, R.J. Immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mutans* in saliva of adults, children, and predentate infants. J Clin Microbiol. 10: 538-543, 1979.
9. Rozen, R., Bachrach, G., Bronshtetyn M. et al. The role of fructans on dental biofilm by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*

- and *Actinomyces viscosus*. FEMS Microbiol Lett. 195(2):205-210, 2001.
10. Brandtzaeg, P. Overview of the mucosal immune system. Curr Top Microbiol Immunol. 146: 13-25, 1989.
 11. Fears, K.P., Gonzalez-Begne, M., Love, C.T., Day, D. E., Koo, H. Surface-induced changes in the conformation and glucan production of glucosyltransferase adsorbed on saliva-coated hydroxyapatite. Langmuir. 31(16):4654-4662, 2015.
 12. Lee. D.H., Seo, B.R., Kim. H.Y., Gum. G.C., Yu. H.H., You. H.K., Kang. T.H., You. Y.O. Inhibitory effect of *Aralia continentalis* on the cariogenic properties of streptococcus mutans. J Ethnopharmacol. 137(2):979-984, 2011.
 13. Park, Y.N., Jeong, S.S., Zeng, J., Kim, S.H., Hong, S.J., Ohk, S.H., Choi, C.H. Anti-cariogenic effects of erythritol on growth and adhesion of streptococcus mutans. Food Sci Biotechnol. 23(5):1587-1591, 2014.
 14. Hur, S.A. The vaccine against dental caries Department of Dental Science, School of Dentistry, Chonnam National University. 2010.
 15. Park, B.I., Jung, W.C., Kim, K.J. et al. Inhibitory effect of galla chinensis extract on cariogenic properties of streptococcus mutans. J physiol & Pathol Korean Med. 29(2):189-194, 2015.
 16. Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., and Yamamoto, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem. 53: 2307-2311, 1989.
 17. Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J Agric Food Chem. 40: 245-248, 1992.
 18. Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y., Hirasawa, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res. 25: 438-443, 1991.
 19. Steinberg, D., Kaine, G., Gedalia, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. Am J Dent. 9: 236-239, 1996.
 20. Chang, K.W., Oh, I.S., Lee, J.H. Effect of dietary erythritol supplemented with chitosan, extracts of *Akebia* and extracts of *1 shige* on the growth of mutans streptococci. J Korea Acad Oral Health. 21(3):1997.
 21. Chang, K.W., Kang, D.O., KIM, H.G. Antibacterial effect and adsorption inhibition of oral streptococci to saliva-coated hydroxyapatite beads with *Akebia quinata* extract. J Korea Acad Oral Health. 21(4):675-684, 1997.
 22. Jang, B.S., Chung, C.P., Son, S.H., Bae. K.H. The effects of honkiol and magnolol on the antimicrobial collagenase activity cytotoxicity and cytokine production. J Korea Acad Periodontol. 23: 145-158, 1993.
 23. Bae, K.H. The antibacterial activities of components isolated from the stem bark of *Magnolia Obovata* against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. Symposium on organic Chemistry Abstract. 176(7):34, 1987.
 24. Shin, K.H., Yang, K.H., Choi, N.K., Kim, S.M., Oh, J.S. The effect of xylitol on the lactose fermentation of streptococcus. J Korean Acad Pediatr Dent. 31(2):202-211, 2004.
 25. Nan, P.H.O. And Chinese medicine encyclopedia illustrations. Ltd. BoYuksa. Osaka. pp 462-463, 1980.
 26. Ishiyaku Shuppan Kabushiki Kaisha. Tokyo. pp 57-58, 1980.
 27. Chang, H.M., and P.P.H But: Pharmacology and applications of chinese materia media. Oriental Healing Arts Institute. Long Beach. p 226, 1986.
 28. Wang, Y.S. Chinese Herbal drug Pharmacology and application. Beijing. People's Medical Publishing House. pp 330-337, 1983.
 29. Shanghai science and technology, Chinese Materia Medica Dictionary (The third edition). Ltd. sohakkwan. Tokyo. pp 2084-2087, 1985.
 30. Jeong, H.J., Kim, K.W., Kim, H.D. Isolation of Herbicidal Compounds from *Pulsatilla koreana* Roots, Korean J.plant. Res. 9(1):47-57, 1996.
 31. Matin, M.L., Moran, A., Roman, L. Pharmacologic screening of *Pulsatilla alpina* subsp. J Ethnopharmacol. 21(2):201-206, 1987.
 32. Woo, W.S. Natural Products chemical Research, Seoul National University PRESS. pp 11-14, 1996.
 33. Lim. H.H., Yoo, S.Y., Kim. K.W., Kook, J.K. Frequency of Species and Biotypes of Mutans Streptococci Isolated from Dental Plaque in the Adolescents and Adults. J Bacteriol Virol. 35(3):197-201, 2005.
 34. Seong, I.H. Comparison of Antimicrobial Activities of Linoleic Acid Isolated from the Roots of *Pulsatilla koreana* NAKAI with Reagent Linoleic Acid against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. J Infect Chemother. 20(4):295-302, 2002.