[UCI]I804:24011-200000234514

2007년 8월

석사학위논문

호주산 propolis의 항균활성과 치주조직에 끼치는 영향

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

주 동 옥

호주산 Propolis의 항균활성과 치주조직에 끼치는 영향

Antimicrobial activity and periodontal effects of propolis

2007년 8월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

주 동 옥

호주산 propolis의 항균활성과 치주조직에 끼치는 영향

지도교수 김 병 옥

이 논문을 석사학위신청 논문으로 제출함

2007년 4월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

주 동 옥

주동옥의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교 수	고 영 무	인
위 원	조선대학교 교 수	장 현 선	인
위 원	조선대학교 교 수	김 병 옥	인

2007년 5월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT ····· iv

I. 서론 ····· 1

II. 연구 재료 및 방법 ····· 2

III. 연구결과 ····· 5

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 9

Ⅴ. 결론 ····· 11

참고문헌 ····· 12

표 목 차

Table 1. Minimum bactericidal concentration of propolis against the periodontopathogens. 6

Table 2. The effects of propolis on proliferation of human gingival fibroblast cells. 7

Table 3. The effects of propolis on proliferation of human periodontal ligament fibroblast cells. 7

Table 4. Changes in sulcus bleeding index and gingival creviculr fluid parameters 1 week after of application by periodontal dressing. 8

Table 5. Patient assessment of packs expressed as number and % of observations in 10 patients. 9

도 목 차

Figure 1. The effects of propolis on proliferation of human gingival fibroblast cells. 7

Figure 2. The effects of propolis on proliferation of human periodontal ligament fibroblast cells. 8

Abstract

Antimicrobial activity and periodontal effects of propolis

Joo Dong-Ok, D.D.S.
Advisor: Kim Byung-Ock, D.D.S., M.S.D., Ph.D
Graduate School of Chosun University

Proplolis is a naturally-occurring bee products and has been used in folk medicine for several purposes such as an antiseptic, anti-inflammatory, antimycotic and bacteriostatic agent. The aim of the present work was to evaluate the antibacterial activity and periodontal effects of Australian propolis (Green-One natural health, Sydney, Australia).

Antibacterial effect of diluted propolis on seven oral pathogens, *Prevotella intermedia (Pi)*, *Prevotella nigrescens (Pn)*, *Porphyromonans endodontalis (Pe)*, *Porphyromonas gingivalis (Pg)*, *Tannerella forsythensis (Tf)* *Actinobillus actinomycetemcomitans (Aa)*, and *Fusobacterium nucleatum (Fn),* were tested and their cytotoxic effect on human gingival fibroblasts (hGF) and periodontal ligament fibroblasts (hPDLF) were evaluated by MTT. Cell viability assays were performed using third to fourth-passage of hGF and hPDGF. And, for investigating the periodontal effect of propolis, gingival creviculr fluid (GCF) and sulcular bleeding index (SBI) were measured 10-day after applying diluted propolis with periodontal pack.

MTT assay had demonstrated that $1/2^7$ dilution of propolis had antimicrobial effect and was safe for hGF and hPDLF. After applying diluted propolis with periodontal pack, GCF was significantly reduced but SBI showed decreasing tendency.

Author confirms that propolis has antiseptic, antibacterial and antiinflammatory properties if appropriate dilution can be prepared. And, more researches are needed to find out the appropriate diluted propolis solutions which are less cytotoxic for tissue cells but present strong antibacterial properties, and promote the wound healing.

Ⅰ. 서 론

치주질환은 치아를 둘러싸고 있는 조직들에 병변이 발생된 것으로, 그 임상증상은 비슷하나 질환의 원인에 따라 다양하게 분류되고 있다. 가장 흔하게 나타나는 치태관련 치주질환은 기본적으로 스켈링과 치근활택술과 같은 기계적인 처치와 유지관리프로그램에 의해 건강한 치주조직을 유지할 수 있지만, 몸 상태가 좋지 않을 경우에는 항생제와 같은 항균제를 보조적으로 사용해야 한다.

항생제는 치주치료의 보조요법으로 전신적 또는 국소적으로 투여하고 있으나, 전신적인 항생제 투여시 항생제에 대한 내성을 갖는 치태세균이 검출될 수 있다.[1] 따라서 현재 이런 단점을 극복하기 위하여 생약성분의 천연추출물에서 새로운 항세균제를 찾으려는 노력이 증가되고 있다.

이 연구에 사용된 propolis는 꿀벌이 다양한 식물성 원료로부터 수집해서 만든 수지상의 물질로 벌집을 유지하고 만드는데 사용된 물질로서, 감염을 치료하는데 있어서 지난 수 천년 동안 민간요법으로서 사용되어 오고 있었으며, 오늘날 항균효과, 항염증효과, 국소마취효과, 각종 피부질환에 대한 치료효과와 피부재생효과, 항바이러스 효과, 항우식효과, 화상치료효과, 노화억제, 그리고 면역체계의 강화 등 여러 분야에서 탁월한 효과가 있다고 보고되었다.[2,3,4]

Propolis는 55%의 resinous compound와 balsam, 30%의 beeswax, 10%의 ethereal oil과 aromatic oil, 5%의 bee pollen을 함유하고 있다. 여기에 포함된 화합물로는 amino acids; flavones, flavonols, 그리고 flavanones를 포함한 flavanoids; terpenes; vanillin; tetochrysin; isalpinin pinocembrin chrysin galangin; ferulic acid; caffeic acid; caffeic acid phenethyl ester; cinnamic acid와 chinnamyl alcohol 등이 있다.[5]

Propolis는 동유럽에서 치과치료시 근관학과 치주과에서 소독제로 많이 이용되었다고 보고되었는데, 특히 치주과 영역에서 propolis의 연구를 살펴보면 주로 항균활성에 관련된 것으로, 그람양성균 및 그람음성균에 대하여 광범위한 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다.[6] Rodrigues 등[6]과 Slot 등[7]은 치주조직의 파괴와 관련된 세균들 즉, *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, P. intermedia, F. nucleatum* 등에 대해서 항균활성을 가지고 있다고 하였고, Ghisalberti 등[8]은 이와 같은 propolis의 항균활성은 페놀복합물 특히 flavinoids, phenolic acid와 이들의 esters 때문이라고 하였다.

이와 같이 propolis는 여러 분야에서 치료효과를 발휘하고 있는데, 이 연구에서는 호주산 propolis가 치주질환과 연관된 세균에 대한 항균활성, 사람의 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에 대한 세포적합성, 그리고 propolis를 첨가한 치주포대를 환자의 잇몸에 적용한 후 여러 가지 임상지수와 치은열구액의 변화에 끼치는 영향을 평가하는 것이다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

(1) Propolis

이 연구에는 수용액 1 ml 당 200 mg의 꿀벌 propolis 추출물이 용해된 Australian propolis (Green-One natural health, Sydney, Australia)가 이용되었다.

(2) 연구대상

연구대상은 임상적, 방사선학적으로 검사결과 치은염으로 진단되고, 최근 6개월 이내에 어떠한 항생제 복용이나 치주치료를 받지 않았으며, propolis에 피부 알러지 증상을 호소하지 않은 신체 건강한 남녀 10명을 대상으로 하였다. 분석된 피실험자의 연령은 22세에서 34세까지였으며, 평균 연령은 25.7세였다. 상악 제 1, 2 대구치 부위, 총 40개 치아를 연구대상으로 하였다. 이 치아들에는 propolis를 첨가한 치주포대 (Coe-Pak, USA)를 적용하고 3일간 유지시켰다.

2. 연구방법

(1) 세균 및 세균 배양

이 연구에 사용된 *Prevotella intermedia (Pi)* 1 균주 (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens (Pn)* 1 균주 (ATCC 25261), *Porphyromonans endodontalis (Pe)* 1균주 (ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis (Pg)*1 균주(ATCC 33277), *Tannerella forsythensis (Tf)* 1 균주 (ATCC 43037), *Actinobillus actinomycetemcomitans (Aa)* 1 균주 (ATCC 33384), *Fusobacterium nucleatum (Fn)* 1 균주 (ATCC 23726)는 American Type Culture Collection (ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 균주들 중 *Aa*는 TSV broth (Tryptic soy broth 3%, Yeast extract 0.1%, Vancomycin 5 g/ml, Bacitracin 75 ug/ml, Horse serum10%), *Fn*는 Schaedler broth (Schaedler broth 2.44%, Erythromycin 4 ug/ml) 그리고 나머지 균주들은 P broth (Tryptic soy broth 3%, Yeast extract 0.5%, 0.025% Resazurin 2 ml, Cystein HCl-H_2O 0.05%, Hemin solution 0.5 mg/ml, Vitamin K_1 2 ug/ml)에서 37℃, anaerobic gas mixture (85% N_2, 10% H_2, 5% CO_2) condition으로 24시간 동안 배양하였다.

(2) 최소살균농도(minimum bactericidal concentration; MBC)

프로폴리스의 치주원인균인 *Aa, Fn, Pi, Pn, Pg, Pe,* 그리고 *Tf* 균주들에 대한 성장 억제 및 살균효과를 측정하기 위해 MBC를 측정하였다. 먼저 균주를 각각의 액체배지에서 후기 로그기까지 배양하고, 이를 액체배지에 37℃에서 배양한 후 균주를 파장 450 nm에서 OD값이 0.5가 되도록 희석하였다. Propolis 원액을 96 well plate에 1/10× ~ 1/5,120× 로 2배씩 순차적으로 희석하고, 희석된 각각의 균주들을 100 µl씩 넣은 후 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 각 well의 5 µl를 취해서 혈액한천배지에 도말한 후 2시간 후에 세균이 전혀 배양되지 않은 well의 propolis 값을 MBC 값으로 정하였다.

(3) 사람 치은섬유모세포와 사람 치주인대섬유모세포 배양

이 연구에 사용된 사람의 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포는 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS , GIBCO BRL, USA)과 Antibiotic-Antimycotic (AA , GIBCO BRL , USA)을 혼합한 용액에 보관후 슬라이드 글라스를 위치시켜 조직의 이동을 방지하고 10% Fetal Bovine Solution(FBS, GIBCO BRL, USA)와 Dulbeco's Modified Eagles Medium(DMEM,GIBCO BRL, USA)과 1% Antibiotic-Antimycotic (AA , GIBCO BRL , USA)을 혼합한 용액을 이용하여 37°C, 5% CO_2, 100% 습도 조건에서 배양하였다.

배지는 2일에 한 번씩 교체하고 사람의 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포가 증식함에 따라 계대 배양하고 3 내지 4세대의 세포를 이용하였다. 24-well의 배양접시에 1 ml당 $2x10^5$개의 세포가 되도록 분주하여 2주 동안 배양하였다.

(4) 세포 적합성 평가

24-well의 배양접시에 분주된 세포에서 배양액을 제거하고 7개의 다른 농도(1/64 - 1/4,096)로 배양액에 희석된 propolis 혼합액을 동량으로 각각의 well에 첨가하고 48시간동안 37°C, 5% CO_2, 100% 습도 조건에서 배양하였다.

3-(4,5-dimethylthiozole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)용액을 배지 1 ㎖당 100㎕을 섞어서 각 well의 세포에 첨가하였고, 37°C, 5% CO_2, 100% 습도 조건에서 3 내지 4시간 동안 방치하였다. 반응액을 제거한 후 10% SDS를 함유한 solubilizing solution을 300 ㎕씩 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시키고, 배양접시를 잘 흔든 후 96-well에 200㎕씩 분주하여 ELISA reader (Multiskan®EX, Finland)로 파장 540 nm에서 흑광도를 측정하였다. 이 실험은 3회 반복 시행하였다.

(5) 치은열구출혈지수와 치은열구액 측정[1)]

이 연구를 위하여 선별된 10명의 연구대상의 상악 제 1, 2대구치 협측과 구개측에서 propolis의 치주조직에 끼치는 효과를 평가하기 위하여 치은열구출혈지수 (sulcus bleeding index, SBI)와 치은열구액 (gingival crevicular fluid, GCF)을 측정하였다. 먼저, 초진시에 치은열구액을 측정하였고, 치태세균을 제거하고 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에 독성을 나타내지 않는 농도($1/2^7$)로 propolis를 치주포대에 첨가하여 대상치아에 적용하고 3일간 유지하고 1주일 후 내원시 다시 SBI와 GCF를 측정하였다.

① 치은열구출혈지수 (Sulcus Bleeding index, SBI)

협측이나 구개측으로 근심, 중앙, 원심을 측정하여 가장 높은 치수를 선택하였다.
0: 치은이 건강하고 치은 출혈이 없는 경우
1: 치은 출혈이 있으나 치은 변색과 부종이 없는 경우
2: 치은 출혈과 변색이 있으나 부종이 없는 경우
3: 치은 출혈, 변색, 부종을 수반한 경우
4: 치은 출혈, 변색, 부종 및 궤양이 있는 경우
5: 치은 출혈이 저절로 되고, 변색이 있으며 현저한 부종 및 궤양이 있는 경우

② 치은열구삼출액(Gingival crevicular fluid, GCF)의 측정

치은열구삼출액은 Periotron® 8000(*Oraflow*®, Inc. USA)이용하여 제조회사의 지시대로 설정한 다음 측정하였다. 먼저 0점 조정한 다음 측정 대상치의 협, 구개측에 cotton roll로 격리 및 방습하여 타액 등 기타 물질로부터의 오염을 방지하였다. 압축 공기를 치은쪽으로부터 치관 방향으로 지나가도록 하고, 이러한 압축공기를 가능한 약하게 사용함으로서 치은열구벽을 자극하여 결과에 영향을 미치지 않도록 하였다. 이렇게 건조 시킨 후 1분간 방치함으로써 치은열구내로 삼출액이 유입될 여유을 준 후 흡수성 strip을 치아 순측 혹은 설측 중앙부 치은열구 또는 치주낭 내로 가벼운 저항을 느낄 때 까지 조심스럽게 삽입한 후 60초간 유지하였다가 꺼낸 즉시 Periotron® 8000 (*Oraflow*® Inc. New-York, USA)에 끼워 넣어 15초 후의 최대치를 기록하였다. 초진시 propolis를 첨가한 치주포대를 적용하고 1주일 후에 치은열구삼출액의 용량을 측정하였고, 통계학적으로 분석하였다.

(6) 연구대상자의 치주포대에 대한 평가

연구대상자에게 맛이나 향 그리고 모양과 치주포대의 유지력에 대해 설문조사하고 차후에 치주포대 사용시 선택을 할 것 인지에 대해 조사하였다.

(7) 통계학적 분석

실험결과는 모든 피실험자에 대해 평균±표준편차로 기록하였다. MTT assay에 의한 세포 적합성 평가는 Unpaired t-Test을 통해 평가하였다. Propolis를 첨가한 치주포대를 적용하기 전과 적용한 후의 임상지수와 치은열구액의 비교는 Paired t-Test로 하였다.

Ⅲ. 연구 결과

(1) 최소살균농도(minimum bactericidal concentration; MBC)

Propolis의 배양된 치주병인균에 대한 2시간동안의 최소살균농도는 *Pi* ATCC 25611에서는 0.16% (1/640), *Pn* ATCC 25261과 *Pg* ATCC 33277에서는 0.32% (1/320), *Pe* ATCC 35406과 *Tf* ATCC 43037에서는 2.5% (1/40), *Aa* ATCC 33384에서는 10% (1/10)미만에서 그리고 *Fn* ATCC 23726에서는 0.63% (1/160)였다(Table 1).

Table 1. Minimum bactericidal concentration of propolis against the periodontopathogens

Species and strains \ MBC	MBC (%)(ratio)	$1/2^n$ <MBC(ratio)< $1/2^{n-1}$
Pi ATCC 25611	0.16 (1/640)	$1/2^{10}$ < 1/640 < $1/2^9$
Pn ATCC 25261	0.32 (1/320)	$1/2^9$ < 1/320 < $1/2^8$
Pg ATCC 33277	0.32 (1/320)	$1/2^9$ < 1/320 < $1/2^8$
Pe ATCC 35406	2.5 (1/40)	$1/2^6$ < 1/40 < $1/2^5$
Tf ATCC 43037	2.5 (1/40)	$1/2^6$ < 1/40 < $1/2^5$
Aa ATCC 33384	10 (1/10) <	$1/2^4$ < 1/10 < $1/2^3$
Fn ATCC 23726	0.63 (1/160)	$1/2^8$ < 1/160 < $1/2^7$

MBC:minimum bactericidal concentration. *Pi: Prevotella intermedia, Pn: Prevotella nigrescens, Pg: Porphyromonas gingivalis, Pe: Porphyromonans endodontalis, Tf: Tannerella forsythensis, Aa: Actinobillus actinomycetemcomitans, Fn: Fusobacterium nucleatum..*

(2) MTT assay에 의한 세포 적합성 평가

대조군과 각 농도별로 처치한 실험군을 배양 2일 후 MTT assay를 이용하여 세포활성을 평가하였다. 사람의 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에 대해 propolis는 $1/2^8$ ~ $1/2^{11}$ 의 농도에서 대조군과 비교시에 활성감소가 유의하게 일어났으며 (Table 2, 3. Figure 1, 2), $1/2^6$, $1/2^7$, 그리고 $1/2^{12}$ 농도에서는 세포들에 독성을 나타내지 않았다.

Table 2. The effects of propolis on proliferation of human gingival fibroblast cells

	con.	$1/2^{6}$ (1/64)	$1/2^{7}$ (1/128)	$1/2^{8}$ (1/256)	$1/2^{9}$ (1/512)	$1/2^{10}$ (1/1,024)	$1/2^{11}$ (1/2,048)	$1/2^{12}$ (1/4,096)
M	0.324	1.089	0.531	0.279	0.108	0.217	0.258	0.295
S.D.	0.013	0.063	0.127	0.108	0.078	0.038	0.042	0.046
p-Value		0.002*	0.105	0.545	0.038*	0.030*	0.102	0.391

* : statistically significant from control group at $p<0.05$. con.: concentration. M: mean. S.D.: standard deviation.

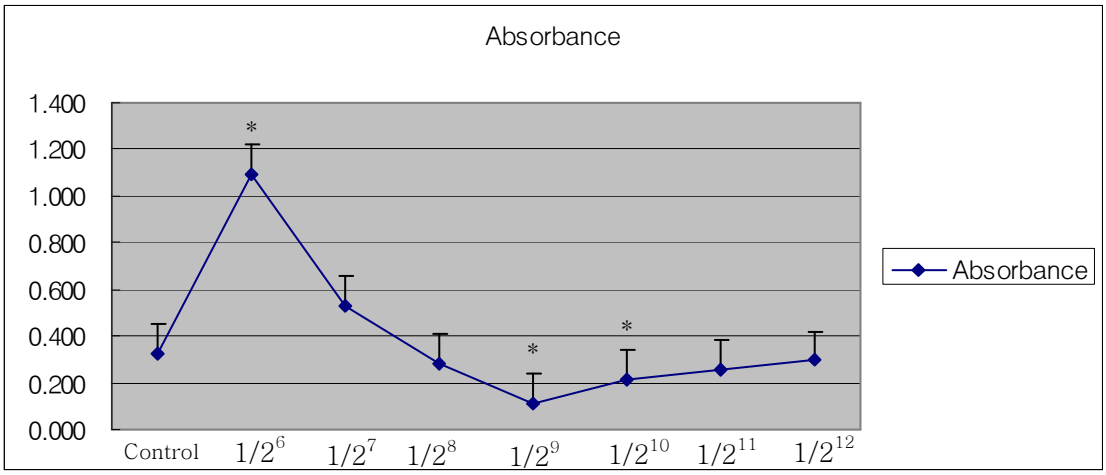

Figure 1. The effects of propolis on proliferation of human gingival fibroblast cells. * : statistically significant from control group at $p<0.05$.

Table 3. The effects of propolis on proliferation of human periodontal ligament fibroblast cells

	con.	$1/2^{6}$ (1/64)	$1/2^{7}$ (1/128)	$1/2^{8}$ (1/256)	$1/2^{9}$ (1/512)	$1/2^{10}$ (1/1,024)	$1/2^{11}$ (1/2,048)	$1/2^{12}$ (1/4,096)
Mean	0.226	0.955	0.361	0.113	0.094	0.125	0.099	0.185
S.D.	0.044	0.332	0.173	0.011	0.022	0.069	0.014	0.077
p-Value		0.060	0.308	0.040*	0.020*	0.111	0.029*	0.483

* : statistically significant from control group at $p<0.05$. con.:control. M: Mean. S.D.:standard deviation.

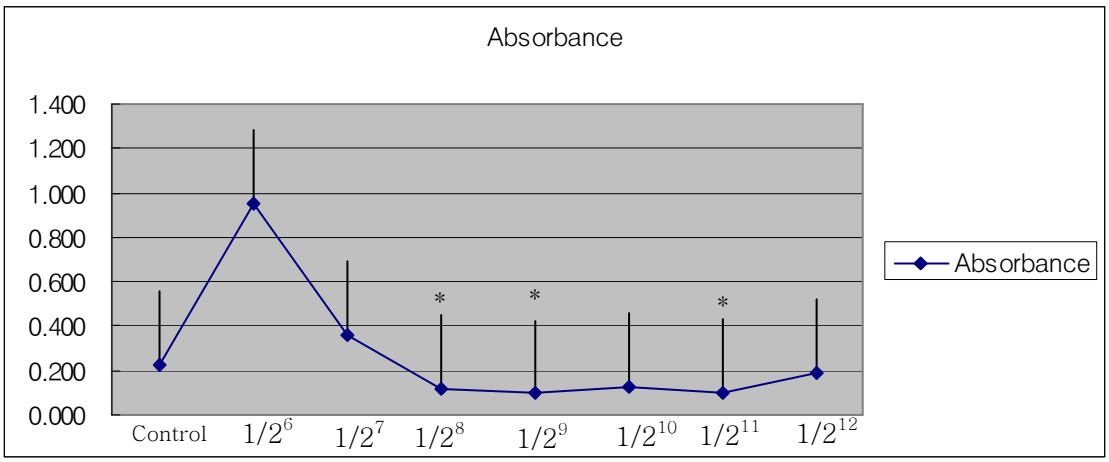

Figure 2. The effects of propolis on proliferation of human periodontal ligament fibroblast cells. * : statistically significant from control group at $p<0.05$.

(3) 임상지수와 치은열구삼출액의 변화량

Propolis가 첨가된 치주포대를 적용 후 10명의 피실험자에서, 협·구개측에서 측정된 치은열구 출혈지수는 초진과 비교시 통계학적으로 유의하게 감소되지 않았으나 ($p>0.05$) 개선되는 경향을 보였으며, 협·구개측에서 측정된 치은열구삼출액은 초진시에 비교시 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$)(Table 4).

Table 4. Changes in sulcus bleeding index and gingival creviculr fluid parameters 1 week after of application by periodontal dressing

index / location	SBI		GCF	
	Buccal	Palatal	Buccal	Palatal
baseline	0.18±0.39	0.28±0.45	109±44.5	114±44.0
1-week after	0.15±0.36	0.18±0.39	54.8±24.7	84.5±44.0
p-value	0.311	0.09	0.00003*	0.012*

* : statistically significant between baseline and results at $p<0.05$. SBI: sulcular bleeding index. GCF: gingival crevicular fluid.

(4) 연구대상자의 평가

절반정도의 피실험자들은 치주포대가 유지되는 동안 치아면과 떨어진 느낌을 호소하였으며, 치주포대의 탈락도 관찰되었다. 치주포대의 형태에 있어서는 불편감이 적었고, 맛과 향에 있어서는 2가

지의 치주포대사이에 명확한 차이가 존재하지 않았다. 그러나 propolis를 첨가한 치주포대가 Coe-Pak보다 더 잘 떨어지는 단점이 존재함에도 불구하고, 20%의 실험자는 propolis를 첨가한 치주포대의 사용을 선호하였다 (Table 5).

Table 5. Patient assessment of packs expressed as number and % of observations in 10 patients

	Coe-Pak(%)	Coe-pak with propolis(%)
dressing loose	5 / 10 (50)	6 / 10 (60)
unpleasant appearance	3 / 10 (30)	1 / 10 (10)
unpleasant taste/smell	5 / 10 (50)	5 / 10 (50)
preferred dressing	6 / 10 (60)	2 / 10 (20)

Ⅳ. 총괄 및 고찰

Propolis가 천연물질이라고 하지만, 과민증[9], allergic cheilitis[10], 그리고 구강 궤양[11]과 같은 반응 초래할 수 있다고 보고되어 이 연구를 시행하기 전에 몇 가지 사항을 고려하여 시험하였다. 먼저 propolis에 대한 과민반응이 있는 지를 확인하였으며, 치주조직에 끼치는 영향을 평가하고자 치은열구액의 유출량을 측정한 다음 치은열구출혈지수를 측정하였으며, 치주조직의 염증반응을 지속적으로 조절하기 위한 방법으로 기존의 치주포대와 함께 섞어 사용하였다.

치은섬유아세포와 치주인대섬유아세포의 MTT 결과를 살펴보면, 대조군과 비교해서 propolis의 희석농도 $1/2^6$에서 세포활성도가 유의성 있게 증가된 것은 뜻밖의 결과이나 이것은 침전물이 생기면서 전반적인 propolis의 농도가 이보다 감소했기 때문이라고 생각된다. 기존의 치주포대에 혼합된 propolis의 희석농도는 (1) 두 섬유아세포가 대조군과 유사한 세포활성을 나타낸 농도 그리고, (2) 검사된 세균들 중에서 *Fn*에 대한 최소살균농도를 감안하여 희석농도 $1/2^7$을 선택하였다. 7개의 세균종중에서 *Fn*의 최소살균농도를 특별히 선정한 이유는 혼합세균막 생태계내에서 *Fn*은 *Pn*과 *Pg* 등 많은 수의 혐기성세균의 생존에 필수적이기 때문이었다.[1] 이 농도로 희석된 propolis를 치주포대에 첨가하여 대상치아에 적용하여 3일간 유지하고 제거한 후 다시 4일 후에 내원시켜 초진시와 동일한 방법으로 측정하였는데, 이것은 접합상피세포의 교환속도를 감안하여 이 프로토콜을 계획하였다.[1]

Propolis의 항균활성에 대한 연구를 살펴보면, 이 연구에서는 배양된 치주병인균에 대한 2시간동안의 최소살균농도는 *Pi* ATCC 25611에서는 0.16% (1/640), *Pn* ATCC 25261과 *Pg* ATCC 33277에서는 0.32% (1/320), *Pe* ATCC 35406과 *Tf* ATCC 43037에서는 2.5% (1/40), *Aa* ATCC 33384에서는 10% (1/10)미만에서 그리고 *Fn* ATCC 23726에서는 0.63% (1/160)였다. Santos 등[12]은 브라질산 propolis의 구강혐기성세균에 대한 항균활성은 propolis내에 포함되어 있는 여러 화합물들의 상승효과 때문이며 세균의 최소억제농도는 64에서 1024 ㎍/㎖라고 하였다. 또한, Sonmez 등[13]은 알콜이 함유되지 않은 호주산 30% propolis를 이용하여 치주질환 원인균에 대한 최소억제농도를 측정하였는데 *Pg, Pi,* 그리고 *Fn* 등은 1/128로 희석된 농도에서, 그리고 미국산 20% propolis를 이용한 연구에서는 *Pg*와 *Pi*에서는 1/256, 그리고 *Fn에서*는 1/128로 희석된 농도에서 성장이 억제되었다고 보고하였다. 위의 연구들은 연구된 세균종에 대해 자세한 기술이 없었고 최소억제농도를 측정하여 이 연구와 비교하기 어려웠다. 그러나 propolis를 적절한 농도로 희석해서 사용한다면 항균효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

Propolis 희석용액의 연구는 대부분이 세균에 관련되어 이루어졌는데 사람을 대상으로 한 연구를 살펴보면, Murray 등[14]은 chlorhexidine 구강양치용액과 propolis 추출물이 10% 함유된 구강양치용액을 이용하여 치태형성 억제효과를 평가하였는데, propolis가 함유된 양치용액은 치태의 재성장을 억제하지 못했다고 보고하면서, propolis와 관련된 문제점은 추출물이 생산지에 좌우되어 변이성이 나타난다는 것이며, 그 화합물의 작용기전은 밝혀져 있지 않다고 하였는데, 향후에는 호주산 propolis의 활

성물질을 규명하는 연구가 지속되어야 할 것이다.

이 연구에서는 치주조직의 염증반응을 지속적으로 조절하기 위한 방법으로 기존의 치주포대에 세포에 독성을 나타내지 않는 희석농도 ($1/2^7$)로 함께 섞어 3일 동안 적용하고 다시 4일 후에 치은열구액과 치은열구출혈지수를 측정하였다.

치주포대는 1923년 Ward에 의해 수술부위에 나타나는 동통, 감염, 치아의 지각과민을 줄이기 위해 처음으로 잇몸수술영역에서 사용되었다.[14] 그러나 치주포대는 치태침착[15,16]과 eugenol과 같은 구성물질에 의한 독성[17]이나 과민증[18]이 일어날 수 있는 단점을 지니고 있어 이러한 단점을 보완하기 위해 non-eugenol pack(Coe-pak)이 개발되어 현재 널리 사용되고 있으며, 정균제와 살균제를 치주포대에 첨가하는 시도[20]가 이루어졌으나 이에 대해서는 임상적인 결과가 제한적이었다.

치은열구액은 염증성 삼출액으로서 치은에 염증이 있을 때, 거친 음식의 저작시, 칫솔질, 치은맛사지, 배란, 호르몬성 피임약, 흡연 등에 의해 증가되며, 1일 주기성을 가지고 있다.[1] 따라서 연구대상을 선정할 때 이러한 요인들을 감안하였으며 1명의 검사자가 초진시와 동일한 시간에, 동일한 방법으로 측정하였다. 이 연구에서 propolis가 첨가된 치주포대를 적용 후 10명의 피실험자의 협·구개측에서 측정된 치은열구삼출액은 초진시와 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였는데, 이것은 propolis의 소염효과를 반영한 것으로 생각된다.

치은열구출혈지수는 치은상태를 객관적으로 쉽게 반복해서 측정할 수 있고 초기 염증 변화 탐지에 매우 유용하며 시진에 의해 접근할 수 없는 치주낭 기저부의 염증성 병소를 탐지하는데 유용하므로 이 연구에 사용되었다.[1] 치은열구출혈지수는 초진과 비교하여 감소되는 경향을 보였는데, 이것은 연구대상의 출혈지수가 낮은 치은염에 국한되었기 때문에 이러한 결과가 도출되었다고 생각된 바, 향후에는 치은열구출혈지수가 높은 환자를 대상으로 한 연구가 시행되어야 할 것이다.

또한, 희석된 propolis를 치주포대와 함께 섞어서 피검자의 치아에 사용했을 때, 기존의 치주포대를 사용했을 때와 비슷한 결과가 나타났으나 선호도에 있어서 약간의 차이가 존재한 바 propolis를 치주포대로 제품화하였을 때 이러한 점을 고려하여야 할 것으로 생각되었다.

이 연구결과 호주산 proplois가 치주병인균과 관련되어 항균활성과 소염효과가 있다고 확인되었는데, Banskota 등[21]이 propolis가 산소유리기를 제거하는 효과를 나타낸다고 보고한 것처럼 치주질환도 과도한 산소유리기 때문에 질환이 진행될 수 있기 때문에 향후에는 치주질환의 병인발생억제에 관한 임상실험, 그리고 창상치유 효과에 대한 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

이 연구는 호주산 propolis가 치주질환과 연관된 세균에 대한 항균활성, 사람의 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에 대한 세포적합성, 그리고 propolis를 첨가한 치주포대를 환자의 잇몸에 적용한 후 치은열구출혈지수와 치은열구액의 변화에 끼치는 영향을 평가하였다.

Propolis의 배양된 치주병인균에 대한 2시간동안의 최소살균농도는 *Pi* ATCC 25611에서는 0.16% (1/640), *Pn* ATCC 25261과 *Pg* ATCC 33277에서는 0.32% (1/320), *Pe* ATCC 35406과 *Tf* ATCC 43037에서는 2.5% (1/40), *Aa* ATCC 33384에서는 10% (1/10)미만에서 그리고 *Fn* ATCC 23726에서는 0.63% (1/160)였다.

대조군과 각 농도별로 처치한 실험군을 배양 2일 후 MTT assay를 이용하여 세포활성을 평가하였는데, 사람의 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에 대해 propolis는 $1/2^8$ ~ $1/2^{11}$ 의 농도에서 대조군과 비교시에 활성감소가 유의하게 일어났으며, $1/2^6$, $1/2^7$, 그리고 $1/2^{12}$ 농도에서는 세포들에 독성을 나타내지 않았다. 치은열구 출혈지수는 초진과 비교시 개선되는 경향을 보였으며, 협·구개측에서 측정된 치은열구삼출액은 초진시에 비교시 통계학적으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$).

이 연구결과 호주산 proplois가 치주병인균과 관련되어 항균활성과 소염효과가 있다고 확인되었는데, 향후에는 치주질환의 병인발생억제에 관한 임상실험, 그리고 창상치유 효과에 대한 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

1. Newman MG, Takei HH, Carranza. FA. CARRANZA'S Clinical PERIDODONTOLGY 9th ed. W.B. Saunders, 2002, 16-35, 96-112, 253-262, 431-453, 675-687.

2. 권영선, 김병옥, 고영무. 수종의 치주질환 원인균에 대한 프로폴리스의 항균효과. 대한치과기자재학회지, 2006. 33(4): 395-405.

3. Ikeno K, Ikeno M, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries rats. Caries Res, 1991, 25:347-351.

4. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, et al. Antibacterial, antifungal ad antiviral activity of propolis of different geographic origin. J Ethnopharmacol, 1999. 64:235-240.

5. Propolis: a background" BDJ. 2006, 200:359-360.

6. Rodrigues PH, Carvalho SA, Costa JE, et al. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in Brazilian adults with periodontal disease. Anaerobe, 1999, 5:267-268.

7. Slots J. "Selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." J Clin Micro, 1982, 606-609.

8. Ghisalberti EL. "Propolis: a review" Bee World, 1979, 60:59-84.

9. Thien FC, Leung R, Baldo BA et al. Asthma and anaphylaxis induced by royal jelly. Clinical and experimental allergy. 1996, 26:216-222.

10. Lombardi C, Bottello M, Caruso A. et al. Allergy and skin diseases in musicians. Allerg Immunol. 2003, 35:52-55.

11. Hay KD, Greig DE. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1990, .70:584-586.

12. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, et al. Antibacterial activity of brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J Ethnopharmacol, 2002, 80:1-7.

13. Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, et al. The effect bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. J Ethnopharmacol, 2005, 102:371-376.

14. Murray MC, Worthington HV, Blinkhorn AS. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. J Clin Periodontol, 1997, 24:796-798.

15. Heaney TG, Appleton J. The effect of periodontal dressings on the healthy periodontium. J Clin Periodontol, 1976, 3:66-76.

16. Newman PS, Addy M. Comparison of hypertonic saline and chlorhexidine mouth rinses after inverse bevel flap procedure. J Periodontol, 1982, 53:315-318.

17. Eber RM, Shuler CF, Buchanan W, et al. Effect of periodontal dressings on human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol, 1989, 60:429-434.

18. Hargeney E. Hensten-Pettersen A. The sensitising potential of periodontal dressings. J Dent Res, 1979, 57:950-953.
19. Newman HN. Modes of application of antiplaque chemicals. J Clin periodontol, 1986, 13: 965-974.
20. Sachs HA, Farnoush A, Checci L, Joseph CE. Current status of periodontal dressings. J Periodontol, 1984, 55:689-696.
21. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J Ethnopharmacol, 2000, 72:239-246.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057734	과 정	석사
성 명	한글: 주 동 옥 한문 : 朱 東 玉 영문 : Joo Dong-ok				
주 소	550-050 전남 여수시 안산동 모아미래도 105동 1102호				
연락처	E-MAIL : Dange92@nate.com				
논문제목	한글 : 호주산 propolis의 항균활성과 치주 조직에 끼치는 영향				
	영문 : Antimicrobial activity and periodontal effects of propolis				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(*0*) 반대( )

2007년 5월 일

저작자: 주 동 옥 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하