



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2008년 12월

博士學位論文

국내산 프로폴리스의 항균효과
및 세포독성평가

조선대학교 대학원

치의학과

노상복

국내산 프로폴리스의 항균효과
및 세포독성평가

Evaluation of the anti-bacterial effect and cytotoxicity
on Korean propolis

2008年 12月 日

조선대학교 대학원

치의학과

노 상 복

국내산 프로폴리스의 항균효과 및 세포독성평가

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위 논문으로 제출함.

2008年 12月 日

조선대학교 대학원

치 의 학 과

노 상 복

노상복의 박사학위 논문을 인준함

위원장 연세대학교 교수 김 광 만 印

위 원 조선대학교 교수 안 종 모 印

위 원 조선대학교 교수 민 정 범 印

위 원 조선대학교 교수 최 한 철 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2008年 12月 日

조선대학교 대학원

목 차

<i>ABSTRACT</i>	iv
제 1 장 서 론	1
제 2 장 이 론	3
2-1. 프로폴리스 개요	3
2-2. 프로폴리스의 항균 및 항산화 효과	5
2-2-1. 프로폴리스의 항균효과	5
2-2-1. 프로폴리스의 항산화효과	5
제 3 장 연구재료 및 방법	7
3-1. 세균배양	7
3-2. 사람 치은모세포 및 사람 치주인대섬유모세포의 배양	7
3-3. 항균평가	8
3-4. 세포독성평가	8
3-5. 통계학적분석	9
제 4 장 연구결과	10
4-1. 프로폴리스의 <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T 에 대한	

항균효과	10
4-2. 프로폴리스의 농도에 따른 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성평가	10
제 5 장 총괄 및 고안	14
제 6 장 결론	18
참 고 문 헌	19

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Antibacterial effect of propolis against <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T	11
Fig. 2. Cytotoxic effect of propolis on human gingival fibroblast (GF)	12
Fig. 3. Cytotoxic effect of propolis on human periodontal ligament fibroblast (PDLF)	13

ABSTRACT

Evaluation of the anti-bacterial effect and cytotoxicity on Korean propolis

Sang-Bok Ro, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Yeong-Mu Ko, Ph.D., DDS

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Propolis exhibits several biological activities such as anti-inflammatory, antifungal, antiviral and tissue regenerative, among others. A Korean propolis demonstrated biological properties against *mutans streptococci*. The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T, and cell viability of human gingival fibroblast (HGF) and periodontal ligament fibroblast (HPDLF) cells. Antimicrobial activity was determined by broth microdilution method and cell viability was measured by MTT assay. The propolis extract significantly inhibited growth of *S. mutans*. The results of MTT assay demonstrated no impact on HGF and HPDLF cells.

제 1 장 서 론

프로폴리스는 꿀벌에 의해서 나무의 수액이나 유실수의 수피, 꽃의 수술로부터 채집되며, 꿀벌의 자기방어 또는 꿀벌집의 보수에 사용되는 물질로서, 주로 수지, 밀납, 정유, 화분, 각종 유기물 및 미네랄 물질로 구성되어 있으며, 항산화 작용뿐만 아니라, 항균, 항진균, 항바이러스, 항종양, 인체면역보강, 상처 치유작용 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다¹⁾. 한편, 프로폴리스내의 각종 유기물과 미네랄 물질에는 플라보노이드가 다량으로 함유되어 있고, 이러한 플라보노이드는 강력한 항균효능을 나타내는 것으로 보고되어 있다²⁾. 프로폴리스의 플라보노이드는 모두 아글리콘인 것이 다른 식물의 플라보노이드와는 다르며, 이 화합물이 프로폴리스의 항균작용에 관여하고 있다. 또한 프로폴리스는 장내세균에 대해서는 항균작용을 하는 것이 아니기 때문에 경구 투여하여도 인체에 유용한 장내 균주, 즉 비피더스균이나 유산균에는 악영향이 없다. 그러므로 프로폴리스는 아무리 섭취해도 독성이 없는 매우 안전한 천연 항균성 물질인 것이다.

구강청정제는 현대인의 식생활변화에 의한 구강 및 치아의 손상에 따라 발생하는 충치, 구취, 치주염을 예방하기 위한 목적으로 이용되고 있다. 현재 시중에 유통되고 있는 구강청정제는 항균효능을 갖는 성분인 불화나트륨, 염화벤제토늄, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 중합체, 염화세틸과이리디늄, 사카린나트륨, 안식향산나트륨 등을 이용하여 충치, 치주염 등을 예방 치료한다. 그러나 이러한 성분들은 삼킬 때 구토, 신경쇠약, 혼수상태, 설사 등의 부작용을 나타내며 과량을 삼킬 경우 인체에 치명적인 손상을 야기한다. 그래서 대부분의 국가에서는 7세 이하의 유아는 구강청정제의 사용을 제한하고 있다. 또한, 장기간 사용 시에는 구강에 손상을 준다는 연구들이 발표되고 있다³⁻⁹⁾. 따라서 최근에는 키토산, 알로에, 녹차 추출물, 솔잎 추출물 등의 천연물을 구강청정제의 조성물로 첨가하는 시도가 이루어지고 있다¹⁰⁻¹²⁾. 그러나

이러한 경우에도 불화나트륨과 같은 화학적 항균제의 문제점이 여전히 존재한다. 이에, 불화나트륨, 염화벤제토늄, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 중합체, 염화세틸피리디늄, 안식향산나트륨 등의 항균제를 사용하지 않고 독성이 없으며 구강에 자극이 없는 천연물로 동일한 효과를 낼 수 있는 구강청정제의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구는 이러한 장점을 가진 천연물 프로폴리스를 추출하여 구강양치용액에 첨가물로 사용할 경우 프로폴리스 원액 또는 희석액이 구강내의 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*에 대한 항균특성과 사람 치은섬유모세포 및 치주 인대섬유모세포에 대한 세포독성을 평가하고자 시행하였다.

제 2 장 이 론

2-1. 프로폴리스의 개요

프로폴리스의 어원은 희랍어로 부터 유래된 것으로 앞을 나타내는 프로와 도시를 나타내는 폴리스의 복합어로 벌들에게는 세균오염으로 부터 봉군을 보호하는데 사용되는 물질이다. 프로폴리스의 특성은 계피나 바닐라 등을 혼합한 것과 같은 독특한 향기가 나며, 지금까지 알려진 프로폴리스의 구성 성분들은 약 150가지 화합물과 22가지 미네랄이 함유된 것으로 알려져 있으며 주요 구성 성분은 수지(樹脂)가 50%이며, 밀납30%, 정유 등의 유성(油性)성분10%, 화분5%, 유기물 및 미네랄 5% 등으로 이루어져 있다. 프로폴리스의 주요 성분으로는 플라보노이드로서 수지를 채집하는 식물의 종류나 채취 장소에 따라 차이가 있다^{13,14)}. 프로폴리스의 구성성분 중 가장 중요한 물질은 플라보노이드(Flavonoid)라고 할 수 있다. 1970년도에 구 소련의 과학아카데미에서 빌라누에바(U.H.Villanueva)박사는 프로폴리스속에 18종의 플라보노이드 성분이 들어 있음을 밝혀냈고 그밖에 항생 성분인 갈란지나 피오세모리나(Galangina Pinoceomorina)가 들어있다고 발표함으로써 벌집 속이 무균상태를 유지할 수 있었던 이유는 프로폴리스의 플라보노이드 성분 때문이라는 사실을 과학적으로 밝힌 바 있다. 독일 키일대학의 벤스 하브스틴(Bent Havesteen)박사는 1980년 5월 제5회 국제 프로폴리스 심포지움에서 「플라보노이드가 풍부하게 함유되어 있는 프로폴리스」라는 논문 발표를 통해 프로폴리스 성분 중 "플라보노이드가 바이러스에 대하여 탁월한 방어력을 가지고 있는 이유는 수 십종의 플라보노이드 성분들이 세균에 대한 강력한 방어벽 역할을 하기 때문이다"라고 했다. 이 방어벽은 세균 및 바이러스의 작용을 무능화시켜 면역상태와 같은 효과를 나타낸다고 발표하였고 "프로폴리스의 생리활성 기능을 나타내는 가장 중요한 성분은 플라보노이드다"라는 것을 밝

허내 이를 학계에 보고 한 바 있다. 플라보노이드는 식물계에 폭 넓게 분포되어 있으나 그 대부분은 배당체로 존재하고 있으며, 프로폴리스에서 발견되는 플라보노이드의 특징은 대부분 가수분해되어 비당분성(aglycon)의 형태로 존재하며 알카로이드 성분이 존재하지 않는다는 점이 식물의 잎이나 줄기에서 발견되는 플라보노이드와는 분명히 다른 특징이 있다. 또한 프로폴리스는 플라보노이드의 함량이 지역별 식물의 분포와 별의 종류에 따라 다르며, 이러한 문제 때문에 프로폴리스를 어떤 특정한 국가의 것이 좋고 나쁘다고 할 수는 없으며 같은 국가에서도 그 지역의 나무 수종(樹種)이나 별의 종류 그리고 오염의 정도에 따라 그 품질이 현격히 달라 질 수밖에 없다. 프로폴리스의 물리적 특성으로는 비중이 1.127로서 15℃에서는 고체 상태로 부서지기 쉬우나 30℃에서는 유연해져 점액성을 띠며, 60℃ 이상에서는 용해되기 시작한다. 그리고 프로폴리스는 꿀벌이 꿀을 보전하기 위하여 벌집의 틈새 등 방을 튼튼하게 하는데 사용되는 물질로 나무에서 수집한 단단한 수지와 밀랍 및 각종 효소를 함유한 꿀벌의 타액 분비물로 부터 만들어지는데 꿀벌들의 집안에서는 다른 곤충과는 달리 해로운 세균, 바이러스 등을 전혀 발견할 수 없으며 이는 꿀벌들이 집을 출입할 때 반드시 몸이 프로폴리스에 접촉되므로 알지 못하는 사이에 병원균이나 바이러스가 살균되는 것으로 추정된다. 이와 같은 사실에 근거하여 프로폴리스의 항 미생물적 특성에 대한 가능성을 알게 되었으며 이외에도 여러 가지 약리효과가 있는 것으로 알려져 예로부터 세계 도처에서 알레르기 비염, 천식 및 피부염 등의 치료에 민간요법으로 사용되어왔다. 또한 현재 동구권에서는 방부, 정균, 수렴, 진경, 소염, 마취효과를 목적으로 이를 화장품, 건강식품, 치약성분 등에 이르기까지 광범위하게 사용하고 있고, 특히 피부과 영역에서는 상처치료, 조직재생, 화상, 신경피부염, 건선, 포진, 및 세균성 습진에도 사용하고 있다^{15,16}.

2-2. 프로폴리스의 항균 및 항산화효과

프로폴리스에 함유된 후라보노이드(Flavonoid)는 대부분의 식물에 존재하며 C6-C3-C6를 기본골격으로 담황색내지는 노란색을 띠고 있는 페놀계 화합물의 총칭이다. 후라보노이드에 대한 생리적, 약리적, 의학적 효능, 효과에 대해서는 많은 연구들이 발표되었다^{17,18)}. 항 돌연변이성을 갖는 후라보노이드로는 flavanol계의 quercetin, kaempferol, myricetin이 있으며 flavone계의 apigenin, luteolin, limonin 및 nomilin등이 알려져 있다. 후라보노이드의 주요 생리적 활성기능으로는 항균작용, 항산화작용 등이 있다.

2-2-1. 프로폴리스의 항균 효과

프로폴리스의 생화학적으로 활성을 가진 주요한 물질은 플라보노이드이다. 플라보노이드는 그람 양성균, 그람 음성 균에 항균작용을 해주는 천연 항생물질로 내성과 부작용이 전혀 없이 인체 내에 온화하게 작용해 준다. 예를 들면 들쥐가 벌통 속으로 들어오면 벌들이 들쥐를 쏘아서 죽이지만 벌들은 죽은 들쥐를 벌통 밖으로 끌어 낼 수가 없어 벌통 안에 그대로 남아 있게 된다. 벌들은 들쥐를 썩지 않게 하기 위해서 죽은 들쥐를 프로폴리스로 둘러싸고, 다음엔 밀랍으로 전체를 싸서 죽은 들쥐가 썩지 않게 ‘미이라’를 만들어 버린다. 프로폴리스의 주요 활성성분은 2가의 페닐기와 파이란환을 기본으로 하는 식물색소인 플라보노이드이며, 그 외에 유기산류, 페놀산류, 방향족 알코올, 알데히드류, 구마린류, 비타민류, 미네랄류등과 같은 160여 가지 이상의 다양한 성분들로 구성되어 있다.

2-2-2. 프로폴리스의 항산화 효과

프로폴리스의 성분으로는 지금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주요 활성성분으로는 수십 종의 플라보노이드(flavonoids)와 비당분성 폴리페놀산(phenolic acid), 에스테르(ester), 폴리페놀 알데하이드(phenolic

aldehydes), 케톤(ketone)과 다량의 왁스, 수지, 발삼, 정유, 화분과 인체에 필수영양소들은 비타민 및 미네랄 등이 풍부하게 함유되어 있어 이러한 성분들은 인간이 섭취 시 강력한 항산화 효과를 나타낸다. 프로폴리스의 플라보노이드 함량은 환경에 따라 차이가 있는데 산지나 채집시기 및 주변의 식물의 종류에 따라 함유성분이나 함량이 다르며 나타나며 효능에도 많은 차이가 있다. 근래에 들어 암과 노화 및 각종 질환의 병인(病因)으로서 활성산소(free radical)가 중요한 요인으로 고려되어지고 있는데 프로폴리스의 플라보노이드 성분은 활성산소의 일종인 DPPH에 대하여 강한 소거효과를 과학적 실험으로 증명하였다. 즉 활성산소를 제거하여 인체 세포의 노화를 막아주고 종양의 원인되는 원인균이 인체에 침투 또는 생성 시 강력하게 소거해 준다는 뜻입니다. 프로폴리스에 함유된 플라보노이드(flavonoids)는 가수분해작용(hydrolysis)를 비롯하여 효소 억제제로서 작용하여 과산화지질의 발생을 방어하는 것으로 알려져 있다. 프로폴리스의 DPPH radical 소거활성 및 지질과산화물 형성 억제효과로 미루어 보아 강력한 항산화 효과가 인정되고 이러한 강력한 항산화 효과는 프로폴리스가 함유하고 있는 플라보노이드로 인하여 작용한다. 프로폴리스에 함유되어 있는 플라보노이드의 특징은 비 당성으로 식물에서 추출된 플라보노이드와는 달리 당분을 함유하고 있지 않다는 점이 특징으로 플라보노이드가 인체의 세포막의 수용체에 결합하면 세포막에 존재하는 아데닌산이 활성화되며 다시 단백질 분해효소인 단백키나제가 활성화 되어 그 에너지에 의하여 세포가 활성화되면서 나타나는 과도한 활성산소를 포착하여 제거하는데 플라보노이드가 관여하여 강력한 항균 및 항산화 효과를 가지고 있다는 것을 영국의 자연과학자 제임스 편리박사에 의해 2001년도에 세계 프로폴리스 심포지움에서 연구 논문을 발표했다.

제 3 장 연구 재료 및 방법

3-1. 세균배양

본 연구에 사용된 *Streptococcus mutans* ATCC 25175^T는 America type culture collection (ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이들 세균들은 Todd Hewitt broth (TH broth, Difco, Lab., Detroit, MI, USA)에 접종하고, 37°C CO₂ 세균 배양기에서 24시간 배양하여 다음의 실험에 이용하였다.

3-2. 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포의 배양

사람 정상 치은섬유모세포는 문헌¹⁹⁾에 제시된 방법으로 일차배양(primary culture)하여 사용하였다. 사람 치은섬유모세포는 제3대구치를 발치하는 환자의 retromolar pad쪽의 치은 조직으로부터 분리 배양하였고, 사람 치주인대섬유모세포는 교정치료를 위해 발거되는 소구치의 치근부 2/3에 위치는 치주인대로부터 분리 배양하였다. 환자의 연령은 23세 미만, 전신질환 및 치주질환이 없고, 비흡연자, 및 최근 3개월간 항생제 투여를 받지 않은 경우에만 조직을 채취하였다. 사람 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포는 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, USA)과 1% Antibiotic-Antimycotic (AA, Gibco BRL, USA)가 혼합된 세포배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 배지는 2일에 한 번씩 교체하고 사람 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포가 증식함에 따라 계대 배양하고 5 내지 6세대의 세포를 이용하여 다음 실험에 이용하였다.

3-3. 항균평가 (*Minimum inhibitory concentration* 측정)

치아우식증의 원인균인 *S. mutans* 표준균주 (ATCC 25175^T)에 대한 항균 작용을 액체배지희석법을 이용하여 최소성장억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하여 분석하였다. TH 액체배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 *S. mutans* ATCC 25175^T를 24시간 배양한 후, 세균배양액을 540 nm 파장에 대한 흡광도 (optical density, OD)값이 0.5가 되도록 TH 액체배지로 희석하였다. 가보팜스(주)에서 제공한 프로폴리스 에탄올 추출물원액을 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 및 512 배씩 배양액으로 희석하고, 각 농도별로 희석한 프로폴리스 용액을 24 well plate에 2 μ l씩 분주하고 여기에 앞에서 희석한 세균배양액을 200 μ l씩 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 각각의 프로폴리스 농도에서 육안으로 세균 성장이 보이지 않는 well 중에서 가장 낮은 프로폴리스가 함유된 농도를 MIC라고 정의 하였다.

3-4. 세포독성평가

MIC 값의 4배, 2배, 1배, 1/2배로 희석한 프로폴리스 농도에서 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성을 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 분석법을 통하여 측정하였다. 24-well의 세포 배양접시에 분주된 세포에서 배양액을 제거하고 앞에 서술한 4 가지 농도의 프로폴리스 용액과 에탄올이 1% 함유된 세포배양액 1 ml씩을 각각의 well에 분주하였고, 음성대조군으로 사용할 세포가 배양되는 well엔 세포 배양액만을 1 ml 분주하였다. 이들 세포들은 전술한 세포 배양조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 기존의 세포 배양액을 모두 제거하고, 배지 1 ml당 MTT 용액을 100 μ l을 섞어 각 well의 세포에 500 μ l씩 첨가하여 전술한 세포배양 조건에서 3 시간 동안 세포배양을 하였다. 그 후 반응액을 제거하고, 1 mM HCl에 10% SDS가 함유된 용

해 용액을 300 μl 를 각 well에 씩 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시키고, 배양접시를 잘 흔든 후 96-well에 200 μl 씩 분주하여 ELISA reader (Multiskan EX, Finland)로 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험군 및 대조군은 각각 3 well 씩 배당하였고, 이를 독립적으로 3회 반복 시행하였다.

3-5. 통계학적 분석

실험결과는 모든 실험군과 대조군에 대해 평균 \pm 표준편차로 기록하였다. 세포독성평가는 Unpaired t-test를 통해 평가하였다.

제 4 장 연구 결과

4-1. 프로폴리스의 *S. mutans* ATCC 25175^T에 대한 항균효과

사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성실험에 사용할 프로폴리스의 농도를 정하기 위하여, 치아우식증의 대표적인 원인 균종인 *S. mutans*의 표준균주(ATCC 25175^T)에 대한 항균효과가 있는 최소 농도(최소성장억제농도)를 구하였다. 그 결과 프로폴리스 원액을 128배 희석한 용액을 배지에 1% 첨가한 군에서 세균이 자라지 않았다 (Fig. 1). 가본농산(주)에서 제공한 프로폴리스 원액의 1,280배 농도가 MIC 값을 알 수 있었다.

4-2. 프로폴리스의 농도에 따른 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성평가

가본농산에서 제공한 에탄올로 추출한 프로폴리스 원액의 1,280배 희석된 농도에서 *S. mutans* ATCC 25175^T에 대한 MIC 값이 측정되었기 때문에 이보다 4배, 2배, 1배, 및 0.5배 농도의 프로폴리스에 대한 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성을 MTT 분석법으로 측정하였다. 그 결과 프로폴리스 원액을 320배로 희석하여 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 24시간 처리 시, 각각 4.7% 및 3.8%의 생존율을 보였지만, 640배 희석한 경우, 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포 각각 96.9% 및 73.8%의 생존율을 보였다. MIC 값인 1,280배 희석된 농도에서는 각각 123.9% 및 101.7%의 생존율을 보였다.

**200 ul of TH broth +
2 ul Bacterial solution**



**2 ul of propolis solution
Bacterial growth**

1 X	1 /2X	1 /4X	1 /8X	1/16 X	1 /32X
—	—	—	—	—	—

**200 ul of TH broth +
2 ul Bacterial solution**



**2 ul of propolis solution
Bacterial growth**

1/64 X	1 /128X	1 /254X	1 /512X	1% Ethanol (-) control
—	—	+	+	+

Fig. 1 Antibacterial effect of propolis against *S. mutans* ATCC 25175^T.

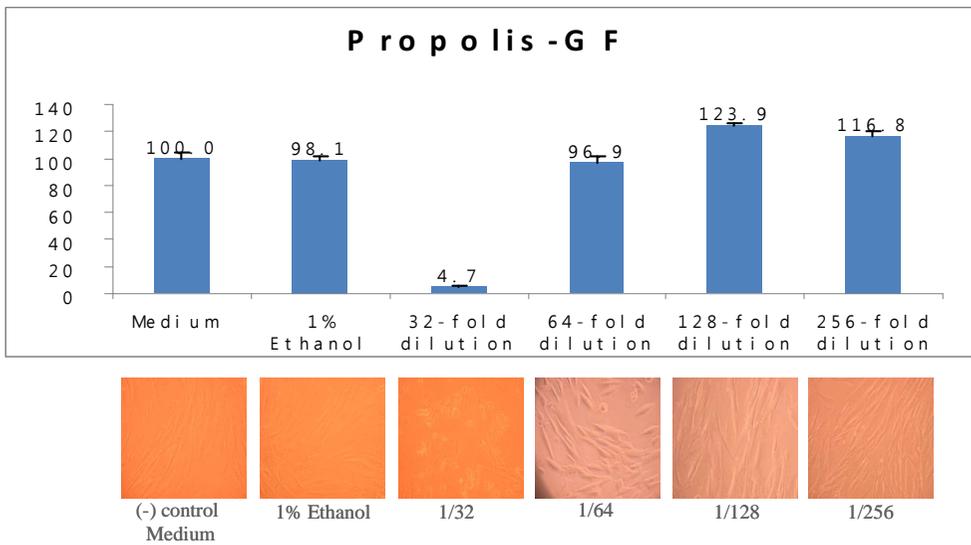


Fig. 2. Cytotoxic effect of propolis on human gingival fibroblast (GF).

(Statistically significant from control group at $p < 0.05$)

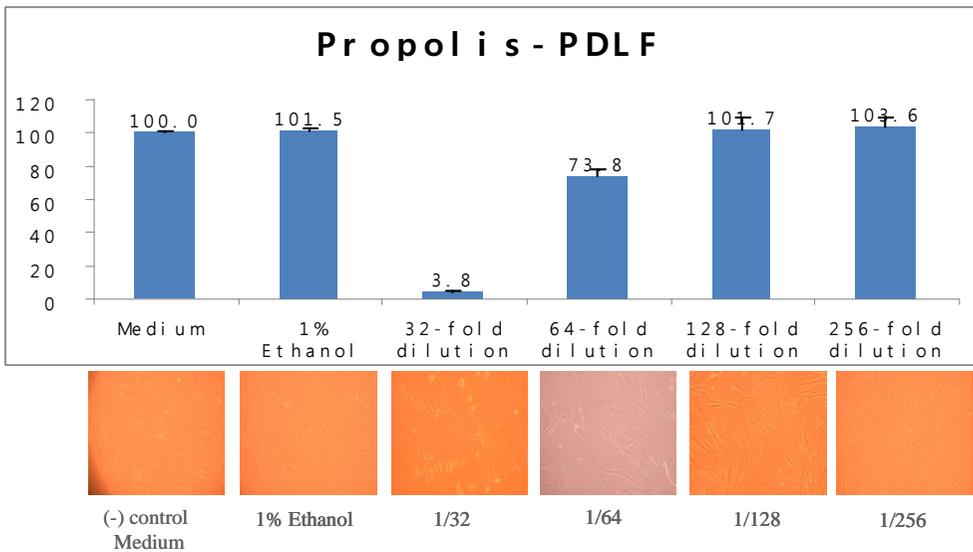


Fig. 3 Cytotoxic effect of propolis on human periodontal ligament fibroblast (PDLF). Statistically significant from control group $p < 0.05$)

제 5 장 총괄 및 고안

본 연구의 결과 국내 가보팜스(주)에서 제공한 국내산 프로폴리스의 에탄올 추출액은 치아우식증의 주요한 원인 균종인 *S. mutans* 표준균주에 대하여 추출액의 1,280배 농도에서 항균작용을 보였다. 권 등²⁰⁾은 가보팜스(주)에서 제공된 프로폴리스 에탄올 추출물에 대한 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*에 대한 항균효과를 보이는 MIC 값을 갖는 농도가 16배 혹은 32배 희석한 것이라고 보고 하였다. 이는 본 연구 결과의 1,280배 희석한 것과 많은 차이를 보였는데, 이는 가보팜스(주)에서 제공된 프로폴리스의 에탄올 추출물의 정제도에 차이가 있었던 것이었다. 프로폴리스에는 약 150여 화합물이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 생산지에 따라 조성물의 종류 및 함량이 다른 것으로 알려져 있다. 가보팜스(주)에서 제공한 데이터에 의하면, 본 연구에서 사용된 프로폴리스에는 약 30여 화합물이 존재함을 액체크로마토그래프 실험을 통해서 알 수 있었다. 이는 권 등²⁰⁾이 사용하였던 프로폴리스 에탄올 추출물이 정제되어, 현재로서는 알 수 없지만 항균 효과를 갖는 특정 화합물의 농도가 높아졌기 때문인 것으로 생각된다. 앞으로 가보팜스(주)의 프로폴리스 에탄올 추출물의 화합물을 좀 더 분획하여 분리한 다음 항균 실험을 시행하고, 그 중 가장 항균 효과가 좋은 분획을 찾아내고, 성분분석을 하는 실험을 진행하여야 할 것으로 생각된다. 만약 그 성분을 찾아내는 일이 성공된다면, 구강을 포함한 전신의 세균 감염성질환을 치료 및 예방할 수 있는 위생용품 개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

항균 물질을 인체 조직부위에 사용하기 위해서는 인체 조직 세포에 대한 독성을 갖지 않아야 한다. 이 연구에서 치아우식증의 주요한 원인균종인 *S. mutans*의 표준균주에 대한 항균작용을 보이는 프로폴리스 에탄올 추출물의 희석 농도를 기준으로 4배, 2배, 1배, 0.5배에서 치은섬유모세포 및 치주인대 섬유모세포에 대한 세포독성 유무를 알아본 결과, 항균력을 보이는 에탄올

추출물의 2배 농도 이하에서는 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 하지만 MIC값의 4배인 농도에서는 강한 세포독성을 보였다. 이러한 이유를 현재의 연구 결과만으로는 알 수 없지만, 항균작용을 보이는 물질이 사람의 세포에도 동일하게 독성작용을 보일 수도 있고, 아니면 세균에 대한 항균작용은 보이지 않지만 사람의 세포에만 독성을 보이는 화합물이 존재할 수도 있기 때문이라고 생각된다. 그러므로 전술한 것과 같이 가보팜스(주)에서 제공된 프로폴리스의 에탄올 추출물을 더 세분하게 정제하여 어떤 물질이 세포에 대한 독성을 보이는지를 알아낸다면, 좀 더 효과적인 항균 효과를 갖는 프로폴리스 추출용액을 개발 할 수 있을 것으로 생각된다. 최근 주 등²¹⁾은 호주산 프로폴리스의 에탄올 추출물을 이용한 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대 섬유모세포에 대한 세포독성 실험 결과, 본 연구와는 고농도(32배 희석액)의 프로폴리스 에탄올 추출물에서 배지만을 이용한 음성 대조군에 비해 세포 활성이 약 4-5배 증가하였고, 반대로 낮은 농도(256-2,048배 희석)에서 세포 활성이 감소하였다. 주 등²¹⁾의 연구와 본 연구의 결과가 정 반대로 나온 결과를 현재로서는 설명하기 매우 힘들지만, 프로폴리스의 원산지에 따른 성분의 종류 및 각 성분들의 조성비율의 차이에 의한 것으로 생각된다. 앞에서 가정하였듯이, 세포에 대한 독성을 보이는 프로폴리스의 성분과 항균력을 보이는 성분이 서로 다를 경우, 프로폴리스의 생산지에 따라 각각에 해당하는 성분의 조성 비율이 틀린 경우라 생각된다. 앞으로 국내 가보팜스(주)에서 제공된 프로폴리스와 주 등²¹⁾이 사용한 호주산 프로폴리스의 성분을 분석하는 실험을 시행하는 것도 필요하리라 생각된다. 지금까지 알려진 프로폴리스의 주요 생물활성작용으로는 항균작용, 항산화작용 등이 밝혀졌으며, 그 작용기전에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 프로폴리스는 세균 감염을 억제하는 용도로 기원전 300년 전에 이미 민간요법으로 이용되어 왔다. 프로폴리스의 항생활성은 수많은 연구에 의해서 검증되었고, 대부분의 연구는 *in vitro*로 이루어져 세균, 효모, 곰팡이 등 광범위한 미생물에 대해 효과적임이 알려져 있고 관련된 연구결과도 매우 많다. 프로폴리스의 항균작용에 대한 최초의

체계적인 연구는 *Streptococcus aureus*에 대해 1948년에 이루어졌다. 이후 프로폴리스의 crude extract, 산지별, 계절별, 추출방법에 따른 비교 및 유효농도에 대한 연구 등이 이루어졌다. 또한 여러 가지 미생물에 대한 성분의 분리 동정에 대한 연구나 neomycin, penicillin 및 streptomycin과 같은 항생제와의 상승효과 등에 대한 연구 등이 광범위하게 이루어져 왔다 또한 동물실험을 통한 생리활성과 특정 질병에 대한 영향 등에 대한 연구도 시도되었다. 프로폴리스 추출물의 항균작용에 대한 최근의 연구들은 프로폴리스의 주요 구성 성분인 플라보노이드류의 항균효과에 대해 초점을 모으고 있다. 1968년 Grange와 Davey에 의하면 프로폴리스 추출물이 *Staphylococcus aureus* 균주의 성장을 저해하는데 매우 효과적이었다고 한다. 더 나아가 3 mg/ml의 농도에서 코지와 그람양성 간균을 선택적으로 저해할 수 있으며 그 주요성분은 갈라긴과 카페인산 에스테르였음을 밝혔다. 프로폴리스는 벌집의 방부, 보존을 위해 사용된 것이므로 강력한 항균작용을 가지고 있는데, Grange 등은 프로폴리스 추출물 자체를 여러 균주에 적용시켰을 때 *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis*와 *Bacillus cereus*의 성장이 강력하게 억제되었고 *Pseudomonas aeruginosa*와 대장균의 성장이 부분적으로 억제되었다고 보고하였다. 프로폴리스의 플라보노이드류에 속하는 25 가지의 함유 성분 중 초균, 황색포도당구균, 아구창칸디다, 모낭백선균에 대한 항균작용은 플라보노이드에 속하는 가란긴, 피노센브린, 피보반쿠신 3-아세틸 피노반쿠신 계피산, p-쿠마르산 벤질에스텔, 카페산, 카페산 에스텔 혼합물이 작용하는 것으로 나타나고 있다. 이 성분들과 5 가지 항생물질을 비교 검토한 결과를 항생제보다 강하지는 않지만 모든 균에 대하여 광범위하게 작용을 하며 모낭백선균에 대해서는 효력이 없는 물질보다 강한 효과를 나타내고 있다. 특히 여드름 발생의 원인이 되는 피부상재균 *Streptococcus epidermidis*, 머리 비듬의 원인이 되는 효모균 *Pityrosporum ovale*, 여성질 염인 트로코모나스균에 대해서 어느 항생제보다 강한 효능을 가지고 있다.

이상의 결과를 종합하면, 치아우식증의 주용한 원인균인 *S. mutans* 표준균주 (ATCC 25175^T)에 대한 항균작용을 보이는 프로폴리스의 농도에서는 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성은 나타나지 않기 때문에 치아우식증 예방을 위한 구강양치용액 및 치약의 첨가제 개발에 응용 가능하리라고 생각된다.

6 장 결 론

구강청결제 및 치약의 첨가제로서 국내산 프로폴리스를 사용하기 위하여 *S. mutans*에 대한 항균실험과 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성 평가를 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 가보팜스(주)에서 제공한 에탄올로 추출한 프로폴리스 원액을 1,280배로 희석된 농도에서 *S. mutans* 표준균주(ATCC 25175^T)에 대한 MBC 값이 측정되었다.
2. MBC 값인 128배로 희석된 프로폴리스 농도에서 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포는 각각 123.9% 및 101.7%의 생존율을 보였다.
3. 프로폴리스 원액을 32배로 희석하여 GF 및 PDLF에 24시간 처리 시, 각각 4.7% 및 3.8%의 생존율을 보였지만, 64배 희석한 경우, 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포는 각각 96.9% 및 73.8%의 생존율을 보였다.

이상의 결과를 종합하면, 치아우식증의 주용한 원인균인 *S. mutans* 표준균주(ATCC 25175^T)에 대한 항균작용을 보이는 프로폴리스의 농도에서는 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포독성은 나타나지 않기 때문에 치아우식증 예방을 위한 구강양치용액 및 치약의 첨가제 개발에 응용 가능하리라고 생각된다.

참 고 문 헌

- [1] Salomão, K., Dantas, A.P., Borba, C.M., Campos, L.C., Machado, D.G., Aquino Neto, F.R., de Castro, S.L., Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Applied Microbiol* 2004; 38, 87 - 92.
- [2] Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Nakajima, S., Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotech Biochem* 1994; 58, 945 - 946.
- [3] Hull PS. Chemical inhibition of plaque. *J Clin Periodontol* 1980; 7:431 - 42.
- [4] Mackie I, Blinkhorn A. Oral Health. Centre for pharmacology, postgraduate education; 1995. p. 33 - 6.
- [5] Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The erosive potential of commercially available mouthrinses on enamel as measured by quantitative light-induced fluorescence (QLF). *J Dent* 2003; 31(5):313 - 9.
- [6] Pontefract H, Hughes J, Kemp K, Yates R, Newcombe RG, Addy M. The erosive effects of some mouth rinses on enamel. A study in situ. *J Clin Periodontol* 2001; 28(4): 319 - 24.
- [7] Addy M, Loyn T, Adams D. Dentine hypersensitivity-effects of some proprietary mouthwash on the dentine smear layer: a SEM study. *J Dent* 1991; 19(3):148 - 52.
- [8] Weiner R, Millstein P, Hoang E, Marshall D. The effect of alcoholic and non-alcoholic mouthwashes on heat-treated composite resin. *Oper Dent* 1997;22(6):249 - 53.

- [9] Asmussen E. Softening of BISGMA-based polymers by ethanol and by organic acids of plaque. *Scand J Dent Res* 1984; 92(3):257 - 61.
- [10] Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agri Food Chem* 1999; 47:3954 - 3962.
- [11] Kim, D. O., Chun, O. K. Y., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agri Food Chem* 2003; 51, 6509 - 6515.
- [12] Kubo, I., Muroi, H., & Himejima, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J Agri Food Chem* 1992; 40, 245 - 248.
- [13] Ghisalberti, E.L., Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60, 59 - 84.
- [14] Markham, K.R., Mitchell, K.A., Wilkins, A.L., Daldy, J.A., Lu, Y., HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 1996; 42, 205 - 211.
- [15] Wang, L., Mineshita, S., & Ga, I. Antiinflammatory effects of propolis. *J J Pharma Therap* 1993; 24, 223 - 226.
- [16] Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharma* 1999; 64, 235 - 240.
- [17] Figueirinha, A., Cruz, T., Lopes, C., & Batista, T. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* infusion. In *Polyphenols Communications* 2006; 499 - 500.
- [18] Kwon, Y. S., Kim, S. S., Sohn, S. J., Kong, P. J., Cheong, I. Y., Kim, C.M., & Chun, W. Modulation of suppressive activity of

lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by glycosidation of flavonoids. Archives of Pharma. Res. 2004; 27(7), 751 - 756.

- [19] Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HS, Kim BO, Han KY. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 282(5), 1145-53.
- [20] 권영선, 고영무, 김병옥, 수종의 치주질환 원인균에 대한 프로폴리스의 항균효과. 대한치과기재학회지. 2006; 33, 395-405.
- [21] 주동욱, 국중기, 김병옥, 김생곤. 호주산 propolis의 항균활성과 치주조직에 미치는 영향. Biomaterials Res. 2008; 12: 102-108.

저작물 이용 허락서

학 과	치의공	학 번	20077439	과 정	박사
성 명	한글: 노 상 복 한문 : 盧 相 福 영문 :Ro Sang Bok				
주 소	경기도 양주시 덕계동 420-10 우리치과				
연락처	010-9991-9876	E-MAIL	sulpuman69@hanmail.net		
논문제목	한글: 국내산 프로폴리스의 항균효과 및 세포독성평가				
	영어: Evaluation of the anti-bacterial effect and cytotoxicity on Korean 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()

2008 년 12 월 일

저작자: 노 상 복 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하