



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

2010년 2월
박사학위논문

2010년
2월

박사학위논문

뮤탄스 연쇄상구균에
대한 Ursolic acid와
Betulinic acid의
항균 효과

김민정

뮤탄스 연쇄상구균에 대한
Ursolic acid와 Betulinic acid의
항균 효과

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 민 정

뮤탄스 연쇄상구균에 대한
Ursolic acid와 Betulinic acid의
항균 효과

Antimicrobial Effect of Ursolic acid and Betulinic
acid against Mutans Streptococci

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 민 정

뮤탄스 연쇄상구균에 대한
Ursolic acid와 Betulinic acid의
항균 효과

지도교수 김 도 경

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2009년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 민 정

김민정의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 흥 중 인

위 원 조선대학교 교수 장 숙 진 인

위 원 조선대학교 교수 안 종 모 인

위 원 조선대학교 교수 국 중 기 인

위 원 조선대학교 교수 김 도 경 인

2009년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 세균 및 배양조건	3
2. 사람 치은점유모세포 및 사람 치주점유모세포의 배양	3
3. Ursolic acid와 betulinc acid의 뮤탄스 연쇄상구균 균주들에 대한 항균성 평가	4
4. Time kill curves	5
5. Ursolic acid와 betulinc acid의 세포독성평가	6
6. 통계적 분석	6
III. 결 과	7
1. Ursolic acid 및 betulinc acid의 뮤탄스 연쇄상구균 균주들에 대한 항균 효과	7
2. Time kill curves	7
3. Ursolic acid와 betulinc acid의 세포독성평가	8
IV. 총괄 및 고안	16
V. 결 론	19
VI. 참고문헌	21

표 목 차

Table 1. Inhibitory effect of ursolic acid against mutans streptococci isolated from Korean	8
Table 2. Minimum inhibitory concentration of ursolic acid against mutans streptococci	9

도 목 차

Fig. 1. Antibacterial effect of ursolic acid against (A) <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T (B) <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 ^T (C) <i>S. downei</i> ATCC 33748 ^T	10
Fig. 2. Antibacterial effect of betulinic acid against (A) <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T (B) <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 ^T (C) <i>S. downei</i> ATCC 33748 ^T	11
Fig. 3. Ursolic acid time kill curves on <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ^T at different ursolic acid concentrations	12
Fig. 4. Ursolic acid time kill curves on <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 ^T at different ursolic acid concentrations	12
Fig. 5. Ursolic acid time kill curves on <i>S. downei</i> ATCC 33748 ^T at different ursolic acid concentrations	13
Fig. 6. Cytotoxicity of ursolic acid on (A) human gingival fibroblasts and (B) human periodontal ligament fibroblasts.	14
Fig. 7. Cytotoxicity of betulinic acid on (A) human gingival fibroblasts and (B) human periodontal ligament fibroblasts.	15

ABSTRACT

Antimicrobial Effect of Ursolic acid and Betulinic acid against Mutans Streptococci

Kim, Min Jung

Advisor : Prof. Do Kyung Kim, Ph.D.

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

Ursolic acid and betulinic acid are triterpenoid compounds that are widely distributed in medicinal plants and other plants. The purpose of this study was to determine the antimicrobial activity of ursolic acid and betulinic acid against mutans streptococci.

The antimicrobial activity was evaluated by minimal inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and time kill curves on mutans streptococci. The cytotoxicity of ursolic acid and betulinic acid on human gingival fibroblasts and human periodontal ligament were tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

MIC₉₀ values of ursolic acid for *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus downei* isolated from Korean were 2 µg/ml, 4 µg/ml and 8 µg/ml, respectively. MBCs values of ursolic acid were 4 µg/ml against mutans streptococci. But betulinic acid did not demonstrate any antibacterial activity against mutans streptococci. Time kill curves were performed for *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T, and *S. downei* ATCC 33748^T in the presence of ursolic acid at their respective

MBC. Ursolic acid 2× MBC were bactericidal against *S. mutans* ATCC 25175^T and *S. downei* ATCC 33748^T after 12 h of incubation whereas 4× MBC was bactericidal against *S. sobrinus* ATCC 33478^T. Ursolic acid was no cytotoxic effect on human gingival fibroblasts and human periodontal ligament in the concentration having antimicrobial effect.

The results indicate that ursolic acid could be useful in the development of oral hygiene products for the prevention of dental caries.

I. 서론

치아우식증은 치면세균막 속 세균들이 음식물로 섭취된 당들을 대사하면서 생산된 유기산들에 의해 치태 내에 pH가 낮아져 법랑질이 부식되어 발생하는 구강 질환이다. 치아우식의 중요한 원인균으로 알려진 뮤탄스 연쇄상구균의 자당효소(invertase)는 자당(sucrose)을 포도당(glucose)과 과당(fructose)으로 분해하고 이로 인해 젖산(lactic acid), 초산(acetic acid), 포름산(formic acid) 등이 생산되면 pH가 낮아져 치태 내의 환경을 산성으로 바꾼다(Moynihan and Petersen, 2004). 또한 뮤탄스 연쇄상구균은 다른 일반적인 치태세균에 비해 낮은 pH에서 증식하고 생존을 유지할 수 있으며, 자당을 이용하여 치태기질인 세포외 다당류(extracellular polysaccharide)를 생산한다(Colby and Russell, 1997; Samaranayke, 2003).

현재 치아우식증을 예방하기 위한 목적으로 불소를 이용한 치약, 구강 양치용액 및 치실 등이 개발되어 사용되고 있으나, 불소과다 섭취는 반상치(mottled teeth)를 유발시킨다(Spencer and Do, 2008). 또한 구강 양치용액으로 사용되는 Chlorhexidine의 과다 사용은 치아 변색의 원인이 되기도 한다(Tredwin 등, 2005). 최근 화학 합성물질에 비해 부작용이 적은 천연추출물을 이용해 구강질환 예방 및 치료에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 국화과에 속하는 목향의 에탄올 추출물은 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)의 성장 및 유기산 생성을 억제하고, *S. mutans*가 타액에 코팅된 수산화인회석에 부착되는 것을 억제하며, 비수용성 글루칸 합성을 억제한다(Yu 등, 2005). 식물의 열매, 씨 및 잎에 함유된 polyphenols의 경우 치아우식증, 치주질환 및 구강암등 구강질환 전반에 걸쳐 효과를 갖는다(Petti and Scully, 2009).

Ursolic acid (3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid)와 betulinic acid (3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid)는 트리테르페노이드(triterpenoid)계 사포닌 성분으로 약초로 쓰이는 식물들에서 유리산 혹은 아글리콘 형태로 존재한다(Liu, 1995; Cichewicz and Kouzi, 2004). Ursolic acid는 *Staphylococcus*

aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* 등 병원성 세균에 대해 높은 항균력을 보이고 로즈마리에서 추출된 ursolic acid는 음식과 관련된 세균과 효모의 성장을 억제시킨다(Liu, 1995; Fontanay 등, 2008). 또한 ursolic acid는 glucosyltransferases의 활성 및 비수용성 glucan 합성을 억제하여 *S. mutans*가 치면에 부착되는 것을 억제하고 세균막 형성을 억제하는데 효과가 있다(Kozai 등, 1987).

Betulinic acid는 자작나무과, 갈매나무과, 도금양과, 감나무과, 작약과 등에서 분리되는 성분이다(Cichewicz and Kouzi, 2004). 켈토포름 아프리카눔에서 추출된 betulinic acid는 HIV-1형 바이러스를 억제하는데 뛰어난 효능이 있다(Theo *et al.*, 2009). 또한 Betulinic acid는 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus* 및 *Staphylococcus epidermidis*등에 대해 항균성을 나타낸다(Chandramu 등, 2003; Cichewicz and Kouzi, 2004; Tanachatchairatana 등, 2008). 그 외에도 말라리아를 치료하는데 효과가 있고 *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis* 및 *Candida albicans* 등 진균을 억제하는 데도 효과가 있다(Chatterjee 등, 2000; Shai 등, 2008).

현재 천연물질에서 추출된 물질들을 이용하여 류탄스 연쇄상구균의 성장을 억제하고 제거하는 방법들이 많이 연구되고 있으나, 대부분의 연구들은 서양인에서 분리 동정된 표준균주들을 이용하여 실험이 이루어지고 있다. 선행연구에서는 한국인에서 분리 동정된 임상균주와 서양인에서 분리 동정된 표준균주에 대한 녹차 추출물의 항균력 실험에서 표준균주와 임상균주들에 대한 최소억제농도(MIC)값이 서로 상이한 결과를 나타내었다(Lim 등, 2003; Lee 등, 2003). 그러므로 본 연구에서는 류탄스 연쇄상구균의 표준균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주들에 대한 ursolic acid 및 betulinic acid의 항균효과를 알아보고, 한국인을 대상으로 치아우식증 예방을 위한 구강위생품에 응용할 수 있는지 알아보고자 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세균 및 세균배양

본 연구에 사용된 *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T는 America type culture collection (ATCC, University Boulevard, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 한국인에서 분리 동정된 *S. mutans* 40균주(ChDC YM3, ChDC YM20, ChDC YM25, ChDC YM26, ChDC YM30, ChDC YM31, ChDC YM37, ChDC YM40, ChDC YM45, ChDC YM47, ChDC YM49, ChDC YM53, ChDC YM54, ChDC YM55, ChDC YM61, ChDC YM62, ChDC YM64, ChDC YM67, ChDC YM69, ChDC YM71, ChDC YM81, ChDC YM82, ChDC YM85, ChDC YM89, ChDC YM90, ChDC YM95, ChDC YM96, ChDC YM211, ChDC YM212, ChDC YM213, ChDC YM214, ChDC YM215, ChDC YM216, ChDC YM217, ChDC YM218, ChDC YM219, ChDC YM220, ChDC YM223, ChDC YM225, ChDC YM230), *S. sobrinus* 15균주(ChDC YS1, ChDC YS4, ChDC YS5, ChDC YS6, ChDC YS7, ChDC YS11, ChDC YS12, ChDC YS13, ChDC YS203, ChDC YS205, ChDC YS206, ChDC YS207, ChDC YS210, ChDC YS211, ChDC YS212) 및 *S. downei* 4균주(ChDC YD1, ChDC YD2, ChDC YD3, ChDC YD4)들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM)에서 분양받아 사용하였다. 이들 세균들은 Todd Hewitt (TH, Difco, Lab., Detroit, MI, USA) 한천배지에 도말하여, 37°C 세균배양기에서 1-2일간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다.

2. 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모대세포의 배양

사람 치은섬유모세포는 제3대구치를 발치하는 환자의 retromolar pad쪽의 치은 조직으로부터 분리 배양하였고, 사람치주인대섬유모세포는 발치 치아로

부터 분리 배양하였다. 환자의 연령은 23세 미만, 전신질환 및 치주질환이 없고, 비흡연자 및 최근 3개월간 항생제 투여를 받지 않은 경우에만 조직을 채취하였다. 사람 치은섬유모세포와 사람 치주인대섬유모세포는 Dulbeco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, USA)에 10% Fetal Bovine Solution (FBS, Gibco BRL, USA)과 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL, USA)이 혼합된 세포배양액을 이용하여 37°C에서 5% CO₂가 첨가되고, 100% 습도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배지는 2일에 한 번씩 교체하고 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포가 증식함에 따라 계대 배양하여 5 내지 6세대의 세포를 다음 실험에 이용하였다.

3. Ursolic acid 및 betulinic acid의 뮤탄스 연쇄상구균 균주에 대한 항균성 평가

3-1. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

Ursolic acid (U6753, Sigma, USA)와 betulinic acid (855057, Aldrich, USA)에 대한 균주들의 항균성을 알아보기 위해 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하여 분석하였다. TH 액체배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 뮤탄스 연쇄상구균을 24시간 배양한 후, 파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 1×10^6 CFU/ml가 되도록 TH 액체배지로 희석하였다. Ursolic acid와 betulinic acid를 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 세균 배양액에 첨가(세균배양액의 1%가 되도록 첨가)하였다. 이때 ursolic acid와 betulinic acid는 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 녹여 사용하였다. 실험의 음성대조군은 DMSO를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 양성대조군은 ampicillin (100 mg/ml)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. 96 well plate에 200 μl 씩 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세균을 넣지 않은 배지의 흡광도와 값을 비교하여 OD 값이 0.05이하인 농도를 MIC 값을 결정하였다. 실험군 및 대조군은 모두 3반복씩 실험하였다. MIC₅₀과 MIC₉₀은 각각 균주의 50%와 90%의

성장을 억제하는 ursolic acid 및 betulinic acid의 농도를 나타낸 것이다.

3-2. 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 측정

Ursolic acid와 betulinic acid에 대한 *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T의 MIC를 측정된 후 그 반응물을 10⁵배 희석하여 10 μ l씩 TH agar plate에 접종하고 다시 37°C에서 24시간동안 배양하여 균주의 집락형성 여부를 확인하였다. 이때 99.9%의 세균이 죽은 ursolic acid와 betulinic acid 농도의 값을 MBC라고 정의하였다. 각각의 실험 균 및 대조균은 모두 3반복씩 실험하였다.

4. Time kill curves

반응시간에 따른 뮤탄스 연쇄상구균 균주들에 대한 ursolic acid의 항균활성을 알아 보기위해 time kill curves를 시행하였다. Ursolic acid를 첨가한 후 시간이 경과함에 따른 *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T에 대한 정균제 또는 살균제 유무를 검사하기 위해 활성 검사를 통해 얻은 MBC값을 기준으로 0.5×MBC, 1×MBC, 2×MBC 및 4×MBC의 농도에서 0h, 3h, 6h, 12h 및 24h 경과함에 따른 활성을 측정하였다. 파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 1×10⁷ CFU/ml가 되도록 TH 액체배지로 희석하고 액체배지 450 μ l에 활성물질을 각각의 농도가 되도록 희석하여 희석된 균주를 50 μ l를 첨가하여 반응시켰다. 반응 시간에 따라 10 μ l를 취하여 각각의 TH 한천배지에 도말하여 48시간동안 배양한 후 형성된 균락을 계수화 하였다. 각 반응은 모두 3반복하여 평균하였다.

5. Ursolic acid 및 betulinic acid의 세포독성평가

MBC 측정에 사용된 ursolic acid와 betulinic acid의 농도 값을 참고하여, 32, 16, 8, 4, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ursolic acid 및 betulinic acid 농도에서 치은섬유모세포 및 치주섬유모세포에 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 각 농도의 ursolic acid 혹은 betulinic acid 용액 및 DMSO가 1% 함유된 세포배양액 1 ml씩을 각각의 well에 분주하였다. 이때 음성대조군으로 사용할 세포가 배양되는 well엔 세포 배양액만을 1 ml 분주하였다. 이들 세포들은 전술한 세포 배양조건에서 24시간 동안 배양 후 기존의 세포 배양액을 모두 제거하고, 배지 1 ml당 MTT 용액 100 μl 을 섞어 각 well의 세포에 500 μl 씩 첨가하여 전술한 세포배양 조건에서 3 시간 동안 세포배양을 하였다. 그 후 반응액을 제거하고, 1 mM HCl에 10% sodium deoxysulfate (SDS; Sigma, USA)가 함유된 용해 용액을 각 well에 300 μl 씩 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시켜 배양접시를 잘 흔든 후 96-well에 200 μl 씩 분주하여 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험군 및 대조군은 각각 3 well 씩 배당하였고, 이를 독립적으로 3회 반복 시행하였다.

6. 통계학적 분석

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

III. 결 과

1. Ursolic acid 및 betulinic acid의 뮤탄스 연쇄상구균 균주에 대한 항균효과

Ursolic acid의 MIC를 측정한 결과, 한국인에서 분리 동정된 *S. mutans*, *S. sobrinus* 및 *S. downei*에 대한 ursolic acid의 MIC₅₀ 값은 각각 2 µg/ml, 2 µg/ml 및 8 µg/ml 이었고 MIC₉₀의 값은 2 µg/ml, 4 µg/ml 및 8 µg/ml이었다 (Table 1). 한국인에서 분리 동정된 *S. mutans* ChDC YM225를 제외한 *S. mutans* 임상균주와 표준균주는 ursolic acid에 대한 MIC 값이 같았다. 또한 *S. sobrinus* ATCC 33478^T에 대한 ursolic acid의 MIC 값은 2 µg/ml이었고 15 임상균주 중 3균주(*S. sobrinus* ChDC YS203, ChDC YS206, ChDC YS207)에 대한 MIC 값은 4 µg/ml로 약간의 상이한 결과를 보였다. *S. downei*의 표준균주에 비해 ChDC YD1를 제외한 한국인에서 분리된 모든 *S. downei*의 임상균주는 ursolic acid에 대해 높은 저항력을 나타냈다(Table 2). 본 연구에 사용된 한국인에서 분리 동정된 모든 뮤탄스 연쇄상구균에 대한 ursolic acid의 MIC₅₀, MIC₉₀ 및 MIC₁₀₀ 값은 각각 2 µg/ml, 4 µg/ml 및 8 µg/ml 이었다(Table 1).

S. mutans ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T에 대한 ursolic acid의 MBC 값은 3균주 모두 4 µg/ml이었다(Fig 1). Betulinic acid는 본 연구에서 사용한 농도에서는 뮤탄스 연쇄상구균에 대해 항균효과를 나타내지 않았다(Fig. 2).

2. Time kill curves

Ursolic acid을 첨가한 후 시간이 경과함에 따른 *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T의 항균활성을 실험하였다. Ursolic acid의 4×MBC와 2×MBC의 농도에서 *S. mutans* ATCC 25175^T에 대해 살균효과를 나타내었다(Fig. 3). 또한 ursolic acid는 *S.*

sobrinus ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T에 대해서도 2×MBC 이상농도에서 살균효과를 나타내었다(Fig. 4 and Fig. 5).

3. Ursolic acid 및 betulinic acid의 세포독성평가

Ursolic acid 및 betulinic acid가 사람 치은점유모세포 및 사람 치주점유모세포에 미치는 독성작용을 알아보기 위해 MTT assay를 실행하였다. 그 결과 치은점유모세포 및 치주점유모세포는 대조군에 비해 ursolic acid의 16 µg/ml 이상 농도에서 세포독성을 보였다(Fig. 6). 또한 betulinic acid의 8 µg/ml 이상 농도에서 치은점유모세포는 낮은 세포생존율을 보였으며, 치주점유모세포에서는 betulinic acid의 4 µg/ml 이상농도에서 세포생존율이 감소하였다(Fig 7).

Table 1. Inhibitory effect of ursolic acid against mutans streptococci isolated from Korea.

Species (n=59)	Concentration of ursolic acid (µg/ml)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
<i>S. mutans</i> (n=40)	2	2	4
<i>S. sobrinus</i> (n=15)	2	4	4
<i>S. downei</i> (n=4)	8	8	8
Total (n=59)	2	4	8

MIC₅₀, minimal inhibitory concentration required to inhibit the growth of 50% of mtans strptococci; MIC₉₀, minimal inhibitory concentration required to inhibit the growth of 90% of mtans strptococci; MIC₁₀₀ minimal inhibitory concentration required to inhibit the growth of 100% of mtans strptococci.

Table 2. Minimum inhibitory concentration of ursolic acid against mutans streptococci.

Species & Strains	Concentration (µg/ml)	Species & Strains	Concentration (µg/ml)
<i>S. mutans</i> ATCC ¹ 25175 ^T	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM214	2
<i>S. mutans</i> ChDC ² YM3	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM215	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM20	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM216	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM25	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM217	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM26	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM218	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM30	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM219	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM31	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM220	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM37	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM223	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM40	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM225	4
<i>S. mutans</i> ChDC YM45	2	<i>S. mutans</i> ChDC YM230	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM47	2	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 ^T	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM49	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS1	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM53	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS4	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM54	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS5	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM55	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS6	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM61	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS7	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM62	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS11	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM64	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS12	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM67	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS13	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM69	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS203	4
<i>S. mutans</i> ChDC YM71	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS205	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM81	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS206	4
<i>S. mutans</i> ChDC YM82	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS207	4
<i>S. mutans</i> ChDC YM85	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS210	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM89	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS211	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM90	2	<i>S. sobrinus</i> ChDC YS212	2
<i>S. mutans</i> ChDC YM95	2	<i>S. downei</i> ATCC 33748 ^T	4
<i>S. mutans</i> ChDC YM96	2	<i>S. downei</i> ChDC YD1	4
<i>S. mutans</i> ChDC YM211	2	<i>S. downei</i> ChDC YD2	8
<i>S. mutans</i> ChDC YM212	2	<i>S. downei</i> ChDC YD3	8
<i>S. mutans</i> ChDC YM213	2	<i>S. downei</i> ChDC YD4	8

ATCC, American Type Culture Collection; ²ChDC, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University; ³KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology; T, Type strain.

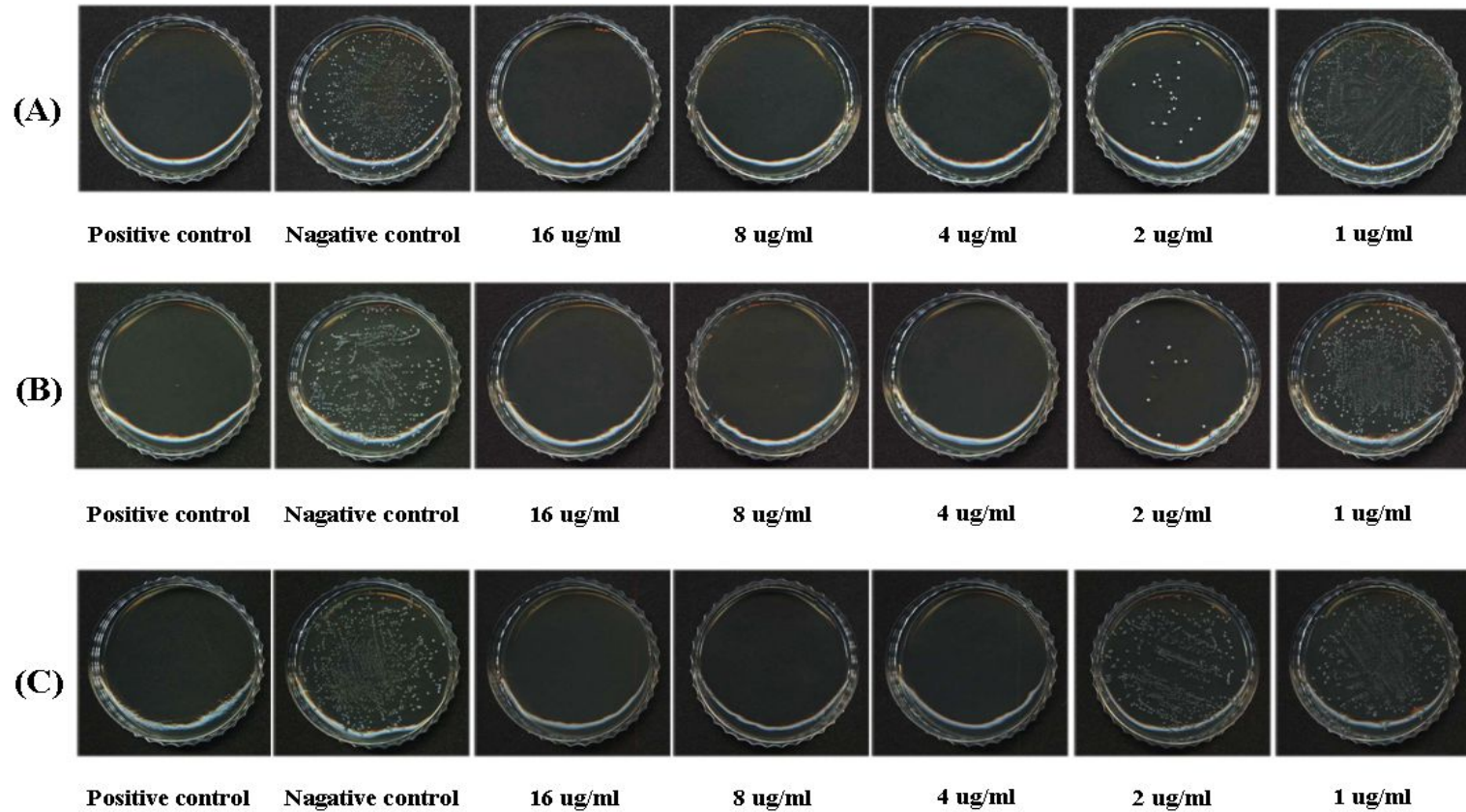


Fig. 1. Antibacterial effect of ursolic acid against (A) *S. mutans* ATCC 25175^T, (B) *S. sobrinus* ATCC 33478^T, and (C) *S. downei* ATCC 33748^T.

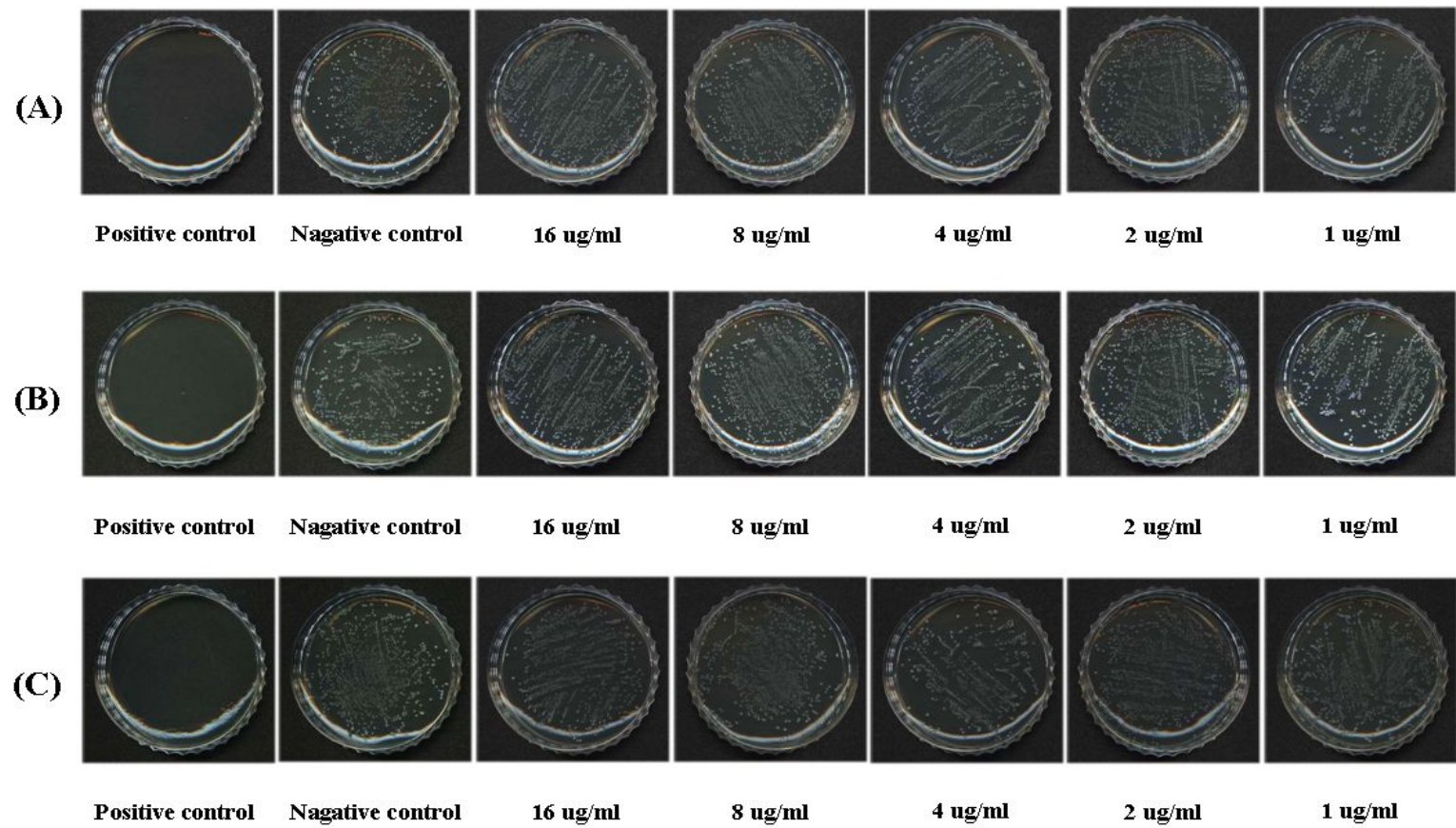


Fig. 2. Antibacterial effect of betulinic acid against (A) *S. mutans* ATCC 25175^T, (B) *S. sobrinus* ATCC 33478^T, and (C) *S. downei* ATCC 33748^T

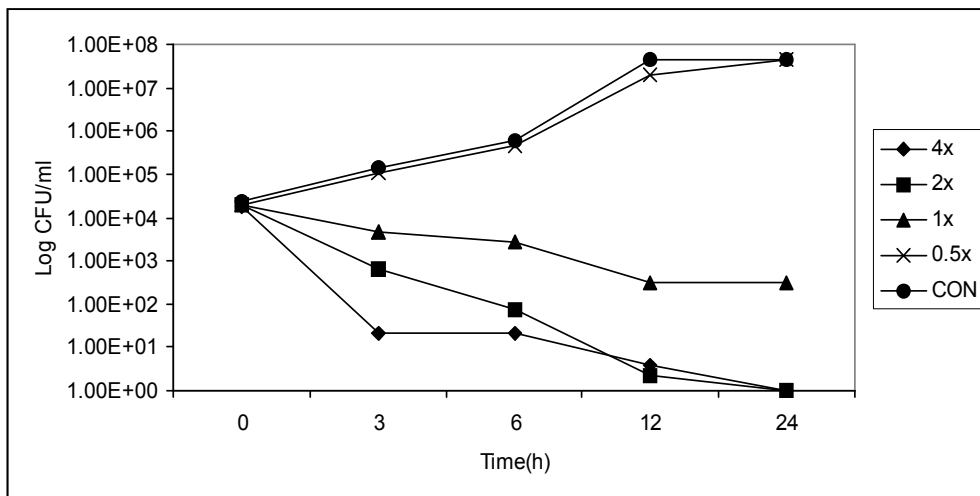


Fig. 3. Time kill curves of ursolic acid on *S. mutans* ATCC 25175^T at different ursolic acid concentrations. ◆, 4 × MBC; ■, 2 × MBC; ▲, 1 × MBC; ×, 0.5 × MBC; ●, control.

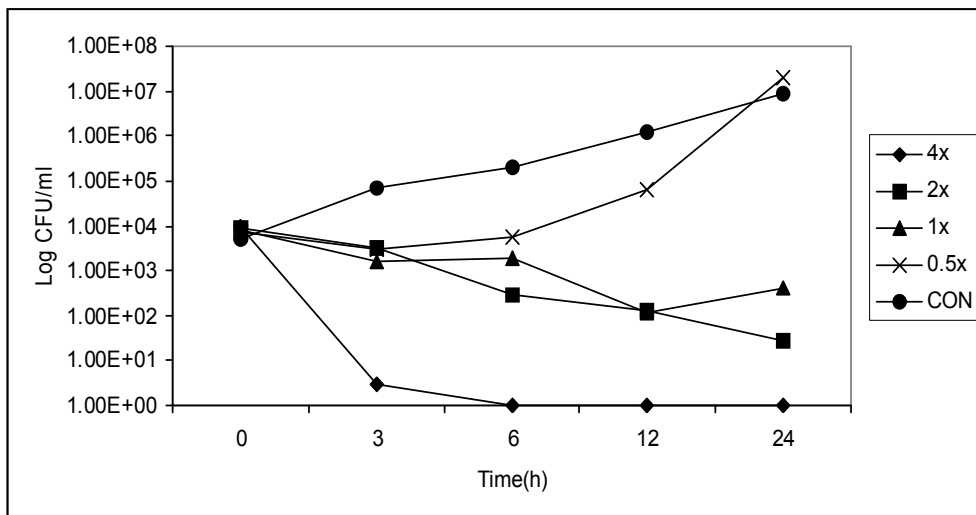


Fig. 4. Time kill curves of ursolic acid on *S. sobrinus* ATCC 33478^T at different ursolic acid concentrations. ◆, 4 × MBC; ■, 2 × MBC; ▲, 1 × MBC; ×, 0.5 × MBC; ●, control.

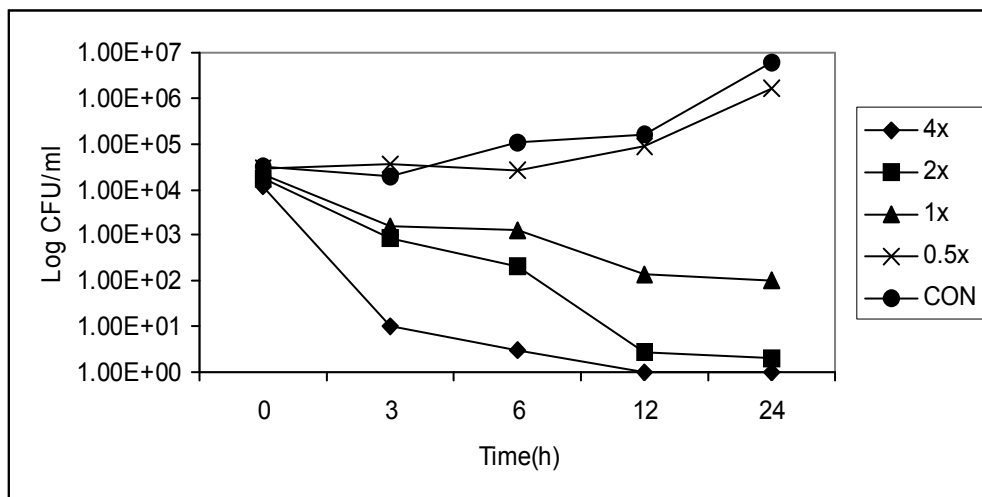


Fig. 5. Time kill curves of ursolic acid on *S. downei* ATCC 33748^T at different ursolic acid concentrations. ◆, 4 × MBC; ■, 2 × MBC; ▲, 1 × MBC; ×, 0.5 × MBC; ●, control.

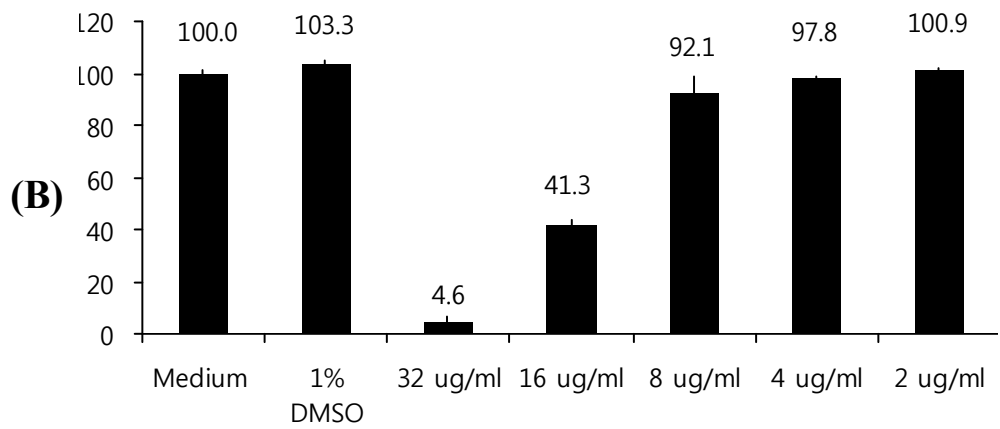
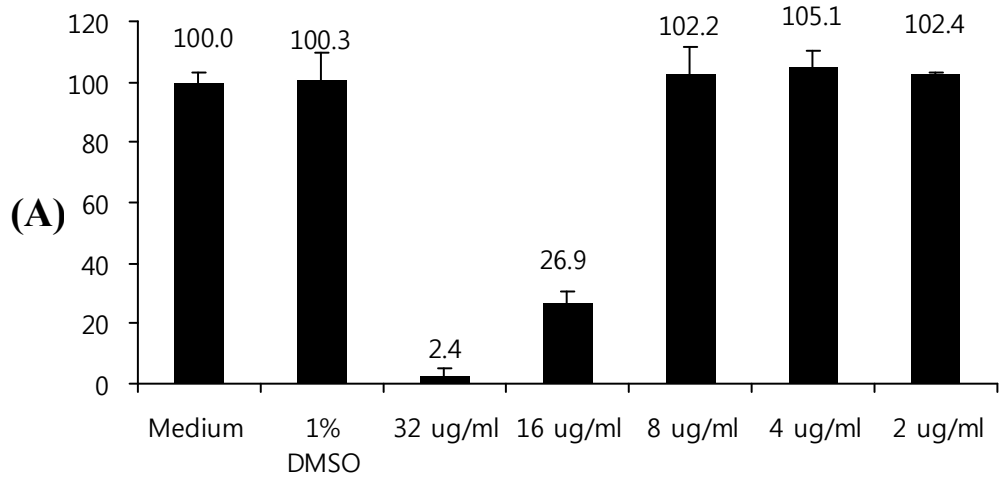


Fig. 6. Cytotoxicity of ursolic acid on (A) human gingival fibroblasts and (B) human periodontal ligament fibroblasts.

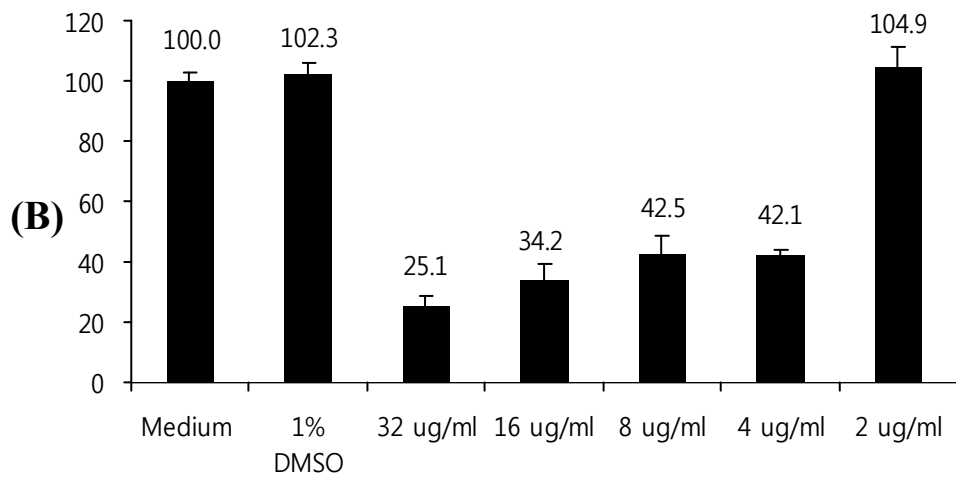
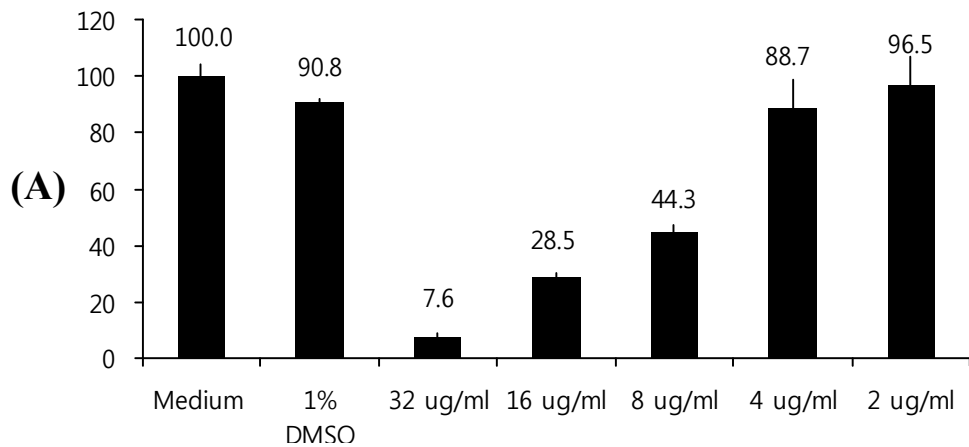


Fig. 7. Cytotoxicity of betulinic acid on (A) human gingival fibroblasts and (B) human periodontal ligament fibroblasts.

IV. 총괄 및 고안

최근 불소와 같은 화학 합성물의 부작용에 대해 알려지면서 인체에 해가 없는 천연물의 추출물로부터 치아우식증 원인균에 대한 항균물질들을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 많은 약용 식물에서 발견되는 성분인 ursolic acid와 betulinic acid가 치아우식증의 주요한 원인균인 뮤탄스 연쇄상구균의 표준균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주에 대한 항균활성을 알아보고자 시행 하였다.

한국인에서 분리 동정된 뮤탄스 연쇄상구균 및 표준균주에 대한 ursolic acid 및 betulinic acid의 항균효과를 알아보기 위해 MIC와 MBC를 실행한 결과 ursolic acid는 뮤탄스 연쇄상구균의 표준균주 및 임상균주에 대해 높은 항균력을 보였다. Caldwell 등(2000)은 트리테르페노이드의 항균작용 기전은 지질이 풍부한 세균벽에 빠르게 침투할 수 있는 화합물의 친유성에 의존한다고 제안하였는데(Caldwell 등, 2000; Mallavadhani 등, 2004), ursolic acid의 C3-OH가 높은 친유성 에스테르 체인과 합성하기 위해 활용된다면 세균벽 침투성이 좋아져 항균효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 순환계 트리테르페노이드(pentacyclic triterpenoid)의 카르복실기에서 γ - 혹은 β - 위치에 이중결합이 존재하고 A 고리에 케톤기가 존재함으로써 항균력을 높인다고 보고되었다(Nick 등, 1995). Ursolic acid의 경우 A 고리에 케톤기가 존재하지 않지만 ursolic acid의 이중결합($\Delta^{12,13}$)이 카르복실기의 γ 위치에 존재한다(Chandramu 등, 2003). 이러한 기전들에 의해 ursolic acid는 세균에 대해 항균력을 갖는 것으로 알려져 있으나 모든 균종에 대해 높은 항균력을 보이는 것은 아니다. Ursolic acid는 그람 음성세균 보다 그람 양성세균에 대해 높은 항균력을 갖는다고 보고되었다(Fontanany 등, 2008; Shai 등, 2008). 또한 한국인에서 분리 동정된 20%의 *S. sobrinus* 및 75%의 *S. downei*는 각각의 표준균주들에 비해 ursolic acid에 대해 높은 저항력을 나타냈다(Table 1 and Table 2). 이는 치아우식증 원인균에 대한 항균력을 갖는 물질을 탐색할

때는 임상균주들을 사용하여 정확한 항균력을 보이는 농도를 구하는 것이 필수적임을 시사한다. 그러므로, 본 연구에서 사용된 한국인 구강으로부터 분리된 뮤탄스 연쇄상구균들은 한국인의 치아우식증 예방제 개발에 있어서 좋은 모델시스템으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

Betulinic acid는 뮤탄스 연쇄상구균에 대해 항균효과를 나타내지 않았다. 선행연구에서 betulinic acid는 높은 농도에서 *Mycobacterium tuberculosis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* 및 *E. coli*에 항균력을 갖는다고 보고되었다(Chandramu 등, 2003, Tanachatchairatana 등, 2008; Shai 등, 2008). 본 연구에서는 *S. mutans*, *S. sobrinus* 및 *S. downei* 균주들 대해 betulinic acid의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서도 MIC를 시행하였으나 항균력을 나타내지 않았다. Betulinic acid와 같은 lupane형의 트리테르페노이드는 oleanan형이나 ursane형에 비해 항균력이 떨어진다고 보고하였다(Tanachatchairatana 등, 2008). 이로 보아 lupane 형은 세균에 대해 낮은 항균력을 갖는 분자의 골격구조를 갖는 것으로 생각된다. 또한 Charles 등(2009)은 Betulin의 고리내에 코우마릴(coumaryl) 치환기가 제거되어 분자사이의 결속력이 강해져 항균력이 감소될 수 있다고 제안 하였다(Mutai 등, 2009).

Ursolic acid을 첨가한 후 반응시간에 따른 뮤탄스 연쇄상구균 표준균주들 (*S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T)의 항균활성을 조사한 결과 2×MBC 농도(8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 ursolic acid는 살균제로 작용함을 알 수 있었다(Fig. 3- Fig. 5). Ursolic acid는 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 사람 치은섬유모세포 및 사람 치주섬유모세포에 대해 독성을 나타내지 않았다. 반면 각질형포 포(HaCaT)와 폐섬유모세포(MRC-5)에 대한 IC₅₀값은 각각 7.5 와 15.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고 청각세포인 HEI-OCI에서는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포독성을 나타내었다(Yu 등, 2006; 양 등, 2008). 이로 보아 ursolic acid는 세포의 종류마다 독성의 차이를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 이러한 보고를 종합할 때, ursolic acid가 뮤탄스 연쇄상구균에 대한 살균력을 갖는 농도에서 구강 조직 세포에 대한 독성을 갖지 않기 때문에 치아우식증을 예

방하기 위한 치약, 구강양치용액, 치실 등의 구강위생용품 개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과를 종합해 볼 때 ursolic acid는 류탄스 연쇄상구균 표준균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주에서 높은 항균력을 나타내었고, 비교적 빠른 시간에 항균활성을 보였으므로 류탄스 연쇄상구균으로부터 야기되는 치아우식증을 효과적으로 예방할 수 있고 한국인을 대상으로 치아우식증 예방을 위한 구강위생품에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 치아우식증의 주요한 원인균인 류탄스 연쇄상구균들에 대해 ursolic acid 와 betulinic acid의 항균효과 알아보고자 실행하였다. Ursolic acid와 betulinic acid의 항균능은 MIC 및 MBC를 시행하여 조사하였고, 이들이 정균제 혹은 살균제 유무를 검사하기 위해 time kill curves를 구하였다. 또한 ursolic acid 와 betulinic acid의 항균능을 보이는 농도에서 치은섬유모세포 및 치주섬유모세포에 대한 생존율을 평가하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 그 결과는 다음과 같았다.

1. *S. mutans*, *S. sobrinus* 및 *S. downei*에 대한 ursolic acid의 MIC₅₀ 값은 각각 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, MIC₉₀의 값은 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.
2. *S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T에 대한 ursolic acid MBC 값은 3균주 모두 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였고, betulinic acid는 세 균주에 대해 항균효과를 나타내지 않았다.
3. Ursolic acid는 3종의 류탄스 연쇄상구균 표준균주(*S. mutans* ATCC 25175^T, *S. sobrinus* ATCC 33478^T 및 *S. downei* ATCC 33748^T)에 대하여 2×MBC 농도(8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)살균제로 작용함을 알 수 있었다.
4. 류탄스 연쇄상구균에 대한 항균능을 보이는 ursolic acid의 농도(8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 사람 섬유모세포 및 사람 치주인대섬유모세포에 대한 세포 독성은 없었다.

이상의 연구 결과를 종합해 볼 때, ursolic acid는 류탄스 연쇄상구균 표준균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주에서 높은 항균력을 나타내었고, 비교적 빠른 시간에 항균활성을 보였다. 그러므로 Ursolic acid는 류탄스 연쇄

상구균으로부터 야기되는 치아우식증을 효과적으로 예방할 수 있어 한국인을 대상으로 치아우식증 예방을 위한 구강위생품에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

- Caldwell CG, Franzblau SG, Suarez E, Timmermann BN. Oleanane triterpenes from *Junellia tridens*. *J Nat Prod*. 2000;63:1611-1614.
- Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DG, Dashavantha RV. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytother Res*. 2003;17:129-134.
- Chatterjee P, Kouzi SA, Pezzuto JM, Hamann MT. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:3850-3855.
- Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev*. 2004;24:90-114.
- Colby SM, Russell RR. Sugar metabolism by mutans streptococci. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1997;26:80S-88S.
- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol*. 2008;120:272-276.
- Kozai K, Miyake Y, Kohda H, Kametaka S, Yamasaki K, Suginaka H, Nagasaka N. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and ursolic acid. *Caries Res*. 1987;21:104-108.
- Lee E-S, Ahn T-Y, Yoon J-J, Kook J-K, Lee BR, Kim DK. Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. *J Korean Acad Dent Health*. 2003;27:569-579.
- Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 1995; 49:57-68.

- Lim S-H, Seo J-S, Yoon Y-J, Kim K-W, Yoo SO, Kim H-S, Kook J-K, Lee B-R, Cha J-H, Park J-Y. Effect of Leaf-Extract from *Camellia sinensis* and Seed-Extract from *Casia tora* on Viability of Mutans Streptococci isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. *Korea. J Orthod.* 2003;33:381-389.
- Mallavadhani UV, Mahapatra A, Jamil K, Reddy PS. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:1576-1579.
- Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr.* 2004;7:201-226.
- Mutai C, Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol.* 2009;123:143-148.
- Nick A, Wright AD, Rali T, Sticher O. Antibacterial triterpenoids from *Dillenia papuana* and their structure-activity relationships. *Phytochemistry.* 1995;40:1691-1695.
- Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent.* 2009;37:413-423.
- Samaranayake LP. Microbiology of dental caries. Essential microbiology for dentistry, 2nd edition. 2003; p. 219.
- Shai LJ, McGaw LJ, Aderogba MA, Mdee LK, Eloff JN. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol.* 2008;119:238-244.
- Siegel MD, Farquhar CL, Bouchard JM. Dental sealants. Who needs them? *Public Health Rep.* 1997;112:98-107.
- Spencer AJ, Do LG. Changing risk factors for fluorosis among South Australian children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008;36:210-218.

- Tanachatchairatana T, Bremner JB, Chokchaisiri R, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008;56:194-198.
- Theo A, Masebe T, Suzuki Y, Kikuchi H, Wada S, Obi CL, Bessong PO, Usuzawa M, Oshima Y, Hattori T. *Peltophorum africanum*, a traditional South African medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid. *J Exp Med*. 2009;217:93-99.
- Tredwin C, Scully C, Bagan-Sebastian J. Drug-induced disorders of teeth. *J Dent Res*. 2005;84:596-602.
- Yu H-H, Seo S-J, Hur Jo-M, Park R-K, So H-S, J B-H, You Y-O. Protective effect of ursolic acid from *Corni fructus* on the hydrogen peroxide-induced damage of HEI-OC1 auditory Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2006;20:1524-1529.
- Yu Y-O, Kim Y-H, Lee J-S, Lee K-H, So H-S, Jeon B-H. Effects of ethanol extract of *Saussurea lappa* on the growth, acid production, adhesion, and insoluble glucan synthesis of *Streptococcus mutans*. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2005;19:1195-1199.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20077549	과 정	박사
성 명	한글: 김 민 정 한문: 金 珉 廷 영문: Kim, Min Jung				
주 소	광주광역시 동구 운림동 라인아파트 203동 1802호				
연락처	E-mail : friendany@hanmail.net				
논문제목	한글: 뮤탄스 연쇄상구균들에 대한 Ursolic acid와 Betulinic acid의 항균효과				
	영문 : Antimicrobial Effect of Ursolic acid and Betulinic acid against Mutans Streptococci				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함. 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함. 6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음. 7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. <p style="text-align: center;"> 동의여부 : 동의(<input checked="" type="checkbox"/>) 반대(<input type="checkbox"/>) </p> <p style="text-align: center;">2010 년 2 월 일</p> <p style="text-align: center;">저작자: 김 민 정 (인)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">조선대학교 총장 귀하</p>					