



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](#)

2012년 8월

박사학위논문

근관감염 원인균에 대한  
berberine의 항균 효과

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 동 균

2  
0  
1  
2  
년  
8  
월

박  
사  
학  
위  
논  
문

근  
관  
감  
염

원  
인  
균  
에

대  
한

b  
e  
r  
b  
e  
r  
i  
n  
e  
의

항  
균

효  
과

이  
동  
균

근관감염 원인균에 대한  
berberine의 항균 효과

The antimicrobial effects of berberine against bacteria  
associated with endodontic infections

2012년 8월 24일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 동 균

근관감염 원인균에 대한  
berberine의 항균 효과

지도교수 황 호 길

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2012년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

이 동 균

이동균의 박사학위논문을 인준함.

위원장	전남대학교	교수	강 인 철 인
위 원	조선대학교	교수	국 중 기 인
위 원	조선대학교	교수	민 정 범 인
위 원	조선대학교	교수	방 일 수 인
위 원	조선대학교	교수	황 호 길 인

2012년 6월

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차 .....	ii
도목차 .....	iii
초록 .....	iv
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
III. 결과 .....	6
IV. 총괄 및 고안 .....	9
V. 결론 .....	13
참고문헌 .....	14

# 표 목 차

Table 1. Antimicrobial effects of berberine hemisulfate ..... 7

# 도 목 차

Figure 1. Effects of berberine hemisulfate on the cell viability of NHGF cells ..... 8



# ABSTRACT

## The antimicrobial effects of berberine against bacteria associated with endodontic infections

Lee, Dongkyun

Advisor : Prof. Hwang, Ho-Keel, D.D.S., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

It has been known that berberine have strong antimicrobial effect. Little is known regarding the antimicrobial activity of berberine against endodontic pathogenic bacteria as well as their cytotoxicity in human oral tissue cells, which are the major subjects of this study. The antibacterial properties of berberine were tested against 5 strains of *Enterococcus faecalis* and type strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, and *Tannerella forsythia*, which are involved in endodontic infections. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the minimum inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC). The cell viability of normal human gingival fibroblast(NHGF) cells, after exposure to berberine was measured using a methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. The data showed that berberine had a remarkable antimicrobial effect on *A. actinomycetemcomitans* with an MIC and MBC of 12.5 µg/ml and 25 µg/ml, respectively. In the cytotoxicity studies, the cell viability was maintained at 31.3 µg/ml by 66.1%. Overall, these findings suggest that berberine has a strong antimicrobial activity against the tested bacteria. Nevertheless, lower concentrations in combination with other reagents will be needed before these *in vitro* results can be translated to clinical use.

**Key words:** Antimicrobial effect, berberine, endodontic infection.

# I. 서론

근관치료의 목적은 치아의 치근단 치주염을 예방하거나 치료하는 것이다.<sup>1</sup> 이를 위해서는 근관계 내의 감염 치수, 감염 상아질, 미생물, 미생물의 산물을 근관계로부터 제거하는 것이 필요하다.<sup>2</sup> 근관 내 감염 물질을 제거하는 방법은 전통적으로 물리적인 방법과 화학적인 방법을 사용하여 왔다. 물리적으로 제거하는 방법은 매우 효과적이다.<sup>3</sup> 그러나, 현존하는 근관치료용 기구의 경우 근관계의 모든 부위를 삭제해 낼 수 없는 것으로 알려져 있다.<sup>4,5</sup>

화학적으로 근관 내 감염 물질을 제거하는 방법은 근관세척과 근관 내 침약이 있다. 근관세척은 차아염소산나트륨, 클로르헥시딘, 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylene diaminetetraacetic acid, EDTA), 요오드요오드화칼륨 등을 용액의 형태로 사용해 왔으며 근관 내 침약으로는 수산화칼슘 등을 사용해 왔다. 근관감염은 혼합감염(polymicrobial infection)의 특징을 가지는데 감염이 진행됨에 따라 관여하는 미생물의 종류에 변화가 발생하고 치근단 조직을 파괴하는데 있어 미생물 간에 상승효과를 나타낸다.<sup>6</sup> 또한, 근관 내의 복잡한 해부학적 구조 및 치근의 두께 만큼 상아세관 내 깊숙이 침투하는 미생물로 인해 감염된 근관을 완전하게 치료하기에는 어려운 점이 있다.

현재 가장 널리 쓰이는 근관세척제는 차아염소산나트륨이다. 이 근관세척제는 그람 양성 및 그람 음성균에 대한 항균능의 범위가 넓고 항진균능을 가지며 조직용해 능력이 있고 근관치료용 기구 조작 시 윤활제로 작용한다.<sup>7</sup> 차아염소산나트륨이 항균능을 발휘하기 위해서는 일정 시간 이상 해당 미생물과 접촉해야 하는데 클로르헥시딘에 비하면 더 많은 접촉 시간을 필요로 한다.<sup>8,9</sup> 클로르헥시딘은 넓은 항균능과 항진균능을 가진다.<sup>10</sup> 또한 근관 내에 적용했을 때 상아질에 흡수되어 항균능이 수 일에서 수 주 간 지속될 수 있다.<sup>11,12</sup> 반면 그람 음성균에 대한 효과가 그람 양성균에 비해 낮다.<sup>13</sup> EDTA는 항균능이 매우 낮고 살균성이 없으나 높은 항진균능을 가진다.<sup>14,15</sup> 또한, 근관 내 미생물에 대한 근관세척제 및 근관 내 침약의 효능을 떨어뜨리는 도말층 내의 무기물질을 제거하고 생물막의 생성을 저해한다.<sup>16,17</sup> 이들 약제 외에도 구연산, 인산, MTAD(mixture of a tetracycline isomer, an acid and a detergent), EDTAC(EDTA and cetavlon), Superoxidized water, 광활성법 등에 대해 근관 내 감염물질을 제거할 목적으로 연구가 이루어지고 있다.<sup>18,19,20,21</sup> 이처럼 다양한 약제들과 방법이 있음에도

불구하고 근관감염 원인균들을 완전하게 제거하는 것은 아직 어려운 문제이므로 근관 세척액 및 근관 내 첩약으로 사용할 수 있는 물질들에 대한 지속적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

Berberine [5,6 - dihydro - 9,10 - dimethoxybenzo(g) - 1,3 - benzodioxolo(5,6 - a) quinolizinium]은 여러 약용 식물의 뿌리, 줄기, 껍질 및 잎에서 발견되는 이소퀴놀린 알칼로이드의 일종으로 황색을 띠며 4차 암모늄염이다. Berberine의 추출원으로는 미나리아재비목(*Ranunculales*)에 속하는 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)의 황련(*Coptis chinensis*), 히드라스티스(*Hydrastis canadensis*), 그리고 매자나무과(*Berberidaceae*)의 매자나무(*Berberis vulgaris*) 등이 있다.<sup>22</sup> 이 물질은 전통적으로 직물, 가죽, 나무의 염색 용도 및 중국, 인도 전통의학에서 사용해왔다.<sup>23</sup> 현대에는 항세균, 항바이러스, 항진균, 항원충류, 항암, 해열, 소염, 진통 등의 항균효과 및 약리효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>23,24,25,26,27,28,47</sup>

Berberine이 여러 세균 종에 대해 항균효과가 있는 것으로 알려져 있음에도 불구하고 근관감염과 관련된 연구는 매우 적다. 그러므로 본 연구에서는 근관 내를 감염시키는 주요한 세균 종들에 대한 berberine의 효능을 평가하고 정상 구강조직에 대한 세포독성을 조사하여 berberine이 근관세척제 혹은 근관 내 첩약으로 사용이 가능한지를 평가하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### II-1. 세균 및 배양

본 연구에서 사용한 균주는 *Enterococcus faecalis* KCTC 3206<sup>T</sup>(=ATCC 19433<sup>T</sup>), *E. faecalis* ChDC YE1, *E. faecalis* ChDC YE2, *E. faecalis* ChDC YE3, *E. faecalis* ChDC YE4, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>, *Prevotella intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *Tannerella forsythia* ATCC 43037<sup>T</sup>였다. 이들 균주들은 한국생명공학연구원 생명자원센터(Korean Collection for Type Culture, Korea), American Type Culture Collection(ATCC, USA), 또는 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

*E. faecalis*는 Todd Hewitt(Difco Lab., USA) 한천배지에 도달하였고 37°C에서 10% CO<sub>2</sub> 세균 배양기로 배양하였다. 그 외의 균주들은 Tryptic Soy broth에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K<sub>1</sub>가 포함된 선택배지, 37°C anaerobic chamber(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., USA)와 혐기성 조건(10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### II-2. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도(mimimun bactericidal concentration, MBC) 측정

최소성장억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정은 NCCLS standard(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000)에 따랐다. 세균들은 선택배지를 이용하여 37°C 에서 24시간동안 세균배양기에서 배양한 후 1×10<sup>6</sup> CFU/ml가 되도록 희석하여 96-well plate에 분주하였다. 사용한 berberine은 berberine hemisulfate(Sigma, USA)이며 2차 증류수에 녹여 filter membrane(0.22 µm)로 여과하여 사용하였다. 음성 대조군으로는 2차 증류수를, 양성 대조군으로는 ampicillin을 100 µg/ml로 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. *E. faecalis* 균주들의 경우에는 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml가 되도록 세균배양액에 첨가(세균배양액의 1%가 되도록 첨가)하였고, 그 외의 균주에는 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml가 되도록 하였다.

사용한 berberine의 농도는 예비실험을 통해 결정하였다. 분주한 세균배양액은 37°C에서 24시간동안 세균배양기에서 배양한 후 96-well plate상에서 육안으로 확인하였을 때 세균 성장이 없는 well의 농도 중 최소 농도를 MIC로 결정하였으며 위의 세균배양액에서 10  $\mu$ l를 취하여 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>배 희석한 뒤 한천배지에 도말하여 37°C에서 24시간동안 배양한 뒤 형성된 균락을 확인하여 한천배지 상에서 균락이 형성되지 않은 최소 농도를 MBC로 결정하였다. 각 반응은 3회 반복하여 평균을 내었다.

### II-3. 사람 정상 치은섬유모세포(normal human gingival fibroblast cells, NHGF)의 배양

NHGF는 조선대학교 치과대학 장현선 교수로부터 분양받아 사용하였다. NHGF는 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, PAA Laboratories, Canada), 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco BRL)이 혼합된 세포배양액을 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기로 배양하였다.

### II-4. 세포 독성 실험

Berberine의 세포 독성을 평가하기 위해 Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) 분석법을 NHGF에 대해 시행하였다.

MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소 효소와 환원효소의 작용에 의해 formazan 결정으로 환원되는데 이 때의 흡광도를 측정하여 생존해 있는 세포의 비율을 계산하게 된다.

24-well plate에 NHGF가 80% 함유되도록 분주하고 31.3, 62.5, 125, 250, 500 및 1000  $\mu$ g/ml의 berberine 용액 및 음성대조군인 배지만 첨가한 군과 2차 증류수가 1% 함유된 세포배양액을 각각의 well에 분주하여 실험하였다. 분주한 well을 37°C에서 24시간동안 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기로 배양하였다. 그 다음에는 기존 세포배양액을 모두 제거하여 10% MTT(Sigma)가 첨가된 배지를 well에 각각 분주하고 동일 조건에서 3시간 동안 배양하였다. 그런 후에 반응액을 제거하였으며 300  $\mu$ l씩의 Isopropanol(Sigma)을 각 well에 첨가하여 잘 흔들어 준 후 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 분주하였다. 마지막으로 595nm 파장에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 이 때 실험군

및 대조군은 각각 3 well씩 배정하고 이를 각각 2회 반복 실험하였다. 그리고 측정된 흡광도의 평균 및 표준편차를 계산하고 대조군 흡광도에 대한 백분율을 산출하였다.

### Ⅲ. 결과

본 연구는 근관감염의 주요한 원인 세균 중에 대한 berberine의 항균능을 평가하기 위해 MIC 및 MBC 값을 조사하였다(Table 1). 본 연구에서 사용한 표준 균주를 포함하여 5개의 *E. faecalis* 균주들에 대한 berberine의 MIC 값은 모두 동일하였다. 하지만, MBC 값은 균주에 따라 250-1,000  $\mu\text{g/ml}$ 으로 차이가 있었다. 이들 균주들 중에서 *E. faecalis* ChDC YE2과 ChDC YE3 균주에 대한 MBC 값이 가장 큰 것으로 조사되었다.

근관감염의 주요한 원인 세균 종인, *A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* 및 *T. forsythia* 각각의 표준균주들에 대한 berberine의 MIC 값은 12.5-50  $\mu\text{g/ml}$  이었으며, MBC 값은 25-100  $\mu\text{g/ml}$  이었다. 특히 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 berberine의 효능이 가장 좋았으며, *P. nigrescens*는 berberine에 대한 저항성이 가장 높은 것으로 나타났다.

NHGF 세포들에 대한 berberine의 독성을 MTT 분석법으로 알아보았다. 그 결과 NHGF 세포들의 생존률은 berberine 농도가 31.3  $\mu\text{g/ml}$ 에서 66.1%로 나타났으며 62.5  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 모두 60% 미만으로 나타났다(Figure 1).

Table 1. Antimicrobial effects of berberine hemisulfate

Species and Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 3206 <sup>T</sup>	250	250
<i>Enterococcus faecalis</i> ChDC YE1	250	500
<i>Enterococcus faecalis</i> ChDC YE2	250	1000
<i>Enterococcus faecalis</i> ChDC YE3	250	1000
<i>Enterococcus faecalis</i> ChDC YE4	250	500
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384 <sup>T</sup>	12.5	25
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563 <sup>T</sup>	50	100
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 <sup>T</sup>	12.5	50
<i>Tannerella forsythia</i> ATCC 43037 <sup>T</sup>	25	100



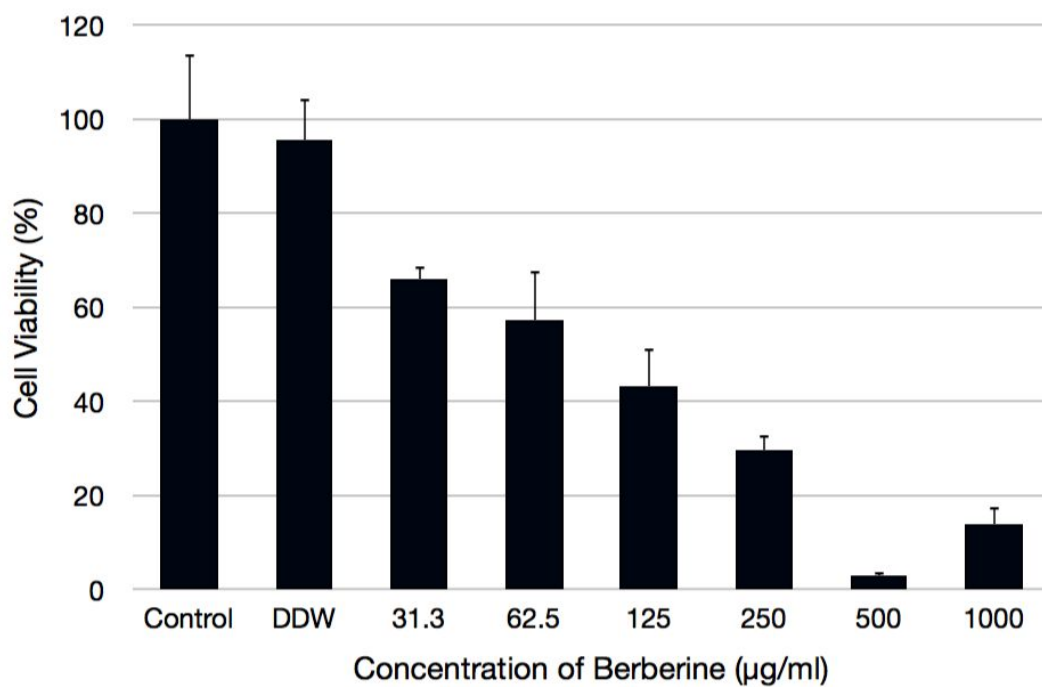


Figure 1. Effects of berberine hemisulfate on the cell viability of NHGF cells.

## IV. 총괄 및 고안

Berberine은 식물로부터 직접 추출하여 사용할 수 있으나, 추출하는 과정에서 다른 성분들이 함께 추출된다. 이러한 추출물의 경우, 함유된 서로 다른 성분들이 상승작용을 할 수 있어 항균작용에 보다 효과적일 수 있다.<sup>29,30</sup> 혹은 berberine 유도체를 사용하는 경우 berberine 보다 항균효과가 더 높을 수 있다.<sup>31</sup> 본 연구에서는 최대한 순수한 berberine의 항균작용을 평가하기 위하여 Sigma 사로부터 berberine을 구입하여 사용하였다.

근관 내 감염이 발생했으며 근관치료를 시행하기 전 상태인 치아와 기존에 근관치료가 이루어졌으며 치근단 치주염을 가지고 있는 치아 사이에는 분리 동정되는 균종과 발생율에 서로 차이가 있다.<sup>6</sup> Özok 등은 치근단 치주염이 있고 근관치료를 시행하지 않은 치아의 근관에서 채취한 세균들을 pyrosequencing을 이용하여 606개의 종으로 분류하고, 근관 내 감염은 근단부의 미생물상(microbiota)이 치관부의 미생물상보다 더 다양하게 나타났다고 보고하였다.<sup>32</sup> 또한 가장 많은 비율로 존재하는 균종으로 치근단부에서는 *Lactobacillus*가 치관부에서는 *Actinomyces*가 관찰되었다. *Lactobacillus*는 감염 근관에서 발생 빈도가 높지만 감염이 진행함에 따라 관여하는 미생물의 종류가 바뀌는데 있어 과도기적인 균종으로 간주되어 왔다.<sup>33</sup> Molander 등은 치근단 치주염이 있는 기존에 근관치료를 받은 치아에서 enterococci가 가장 빈번하게 분리되었다고 하였다.<sup>34</sup> Enterococci중 *E. faecalis*는 처음 근관치료를 받는 치아에서 보다 근관치료가 실패한 증례에서 더 많은 빈도로 존재하였다.<sup>35</sup> 또한 상아세관내로 깊이 침투하며 수산화칼슘에 대해 저항성이 있는 것으로 보고되었다.<sup>36</sup> 최근 Dornelles-Morgental 등은 기구조작 후 차아염소산나트륨으로 근관세척을 하더라도 *E. faecalis*를 근관계 내에서 완전하게 제거할 수 없었다고 보고하였다.<sup>37</sup> Endo 등은 치근단 치주염이 있는 기존에 근관치료를 받은 치아에 관한 연구에서 *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *T. forsythia*가 가장 흔하게 검출되었다고 하였다.<sup>38</sup> Gomes 등은 *P. intermedia*, *P. nigrescens*가 기존에 근관치료를 받았으나 실패한 경우에서 보다 괴사 치수에서 더 흔하게 동정되었다고 보고하였다.<sup>39</sup> 또한 Cao 등은 *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*가 치수 괴사 치아와 근관치료 하기 전의 근관 감염 치아에서 높은 비율로 발견되었다고 하였다.<sup>40</sup> 이외 다른 연구에서는 90% 이상의 근관에서 *T. forsythias*, *A. actinomycetem-comitans*가 발견되었다고 하였다.<sup>41</sup>

본 실험의 결과에 따르면 그람 양성 통성 혐기성균인 *E. faecalis* KCTC 3206<sup>T</sup>는 berberine에 대해 250 µg/ml의 농도에서 감수성을 보였으며 자연형 *E. faecalis*에서 MBC 값은 *E. faecalis* KCTC 3206<sup>T</sup>에 비해 2-4배의 높은 값을 나타냈다. 반면에 그 외의 실험 균주인 그람 음성 혐기성균에서는 12.5-50 µg/ml의 농도에서 감수성을 보였다.

Berberine을 이용한 항균효과 연구들은 *Vibrio cholerae*와 *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*와 *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* 등을 대상으로 실시되었다.<sup>23,30,31,42</sup> 치수 및 치근관 질환 관련 세균 중인 *E. faecalis*에 대한 berberine 연구 논문은 PubMed에서 찾아 볼 수는 없었다. 다만, Moussa 등은 근관치료와 관련하여 2 mg/ml 농도의 berberine의 효과가 2% 클로르헥시딘과 유사하다고 하였다.<sup>43</sup> 본 연구에서는 berberine과 클로르헥시딘 간의 상호 비교 실험을 하지 않았기 때문에 Moussa 등의 연구 결과와 비교를 할 수는 없었다. 하지만, berberine의 효능은 사용된 균주에 따라 약간의 효능의 차이는 있을 것으로 생각된다. 치수 및 치근관 질환의 중요한 원인 균종들 중에는 치주질환의 원인균과 같은 그람 음성 혐기성 균종들이 포함된다. Hu 등은 *Coptidis Rhizoma*에서 추출한 berberine의 *P. gingivalis*(ATCC 33277<sup>T</sup>, W83), *P. intermedia*(ATCC 25611<sup>T</sup>), *P. nigrescens*(ATCC 25261) 및 *A. actinomycetemcomitans*(ATCC 29523, NCTC 9710=ATCC 33384<sup>T</sup>, Y4)에 대한 항균능을 MIC 값을 구하여 조사하였다.<sup>44</sup> 이들 혐기성 세균들에 MIC 값은 균주에 따라 13-200 µg/ml을 가졌다. 하지만, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup> 및 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>에 대한 *C. Rhizoma*에서 추출한 berberine의 MIC 값은 각각 25 µg/ml 및 50 µg/ml으로 본 연구에서 얻은 12.5 µg/ml의 MIC 값보다는 높게 나왔다. 그 이유는 실험에 사용된 berberine의 순도에 따라서 달라질 수도 있고, 사용된 세균 배양액의 조성이 다르기 때문일 것으로 생각된다. 이러한 연구결과들을 살펴보면 berberine은 그람 양성 세균 종보다는 그람 음성 세균 종에 대한 MIC 값이 낮음을 알 수 있었다. 본 연구 결과에서는 그람 양성균보다 그람 음성균에 대한 MIC 값이 약 5-20배 가량 낮게 나타났다.

이러한 감수성의 차이는 세균의 종류에 따라 berberine에 대한 저항성에 차이가 있기 때문일 것으로 생각된다. 항균효과와 관련된 berberine의 기전으로 Ghosh 등은 berberine이 *Leishmania donovani*에서 DNA와 단백질의 합성을 억제하는 것을 보고하였다.<sup>45</sup> Sun 등은 berberine이 lipoteichoic acid-fibronectin 복합체를 직접 분해시킴으

로써 *Streptococcus pyogenes*가 상피세포에 부착하는 것을 억제하는 효과가 있다고 하였다.<sup>46</sup> Wu 등은 *Salmonella typhi*에 대한 연구에서 berberine이 arylamine NAT(N-acetyltransferase) 활성과 mRNA NAT 발현을 억제한다고 보고하였다.<sup>47</sup> 그람 양성균과 그람 음성균은 세포벽의 구성과 그 두께가 서로 다르므로 위에 기술한 기전에 의해 감수성에도 차이가 발생할 것으로 추정되나 명확한 것은 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

차아염소산나트륨은 염소 이온에 의해 강력한 단백분해 효과를 가지므로 괴사 치수 조직, 근관 내 미생물 등의 유기물질을 제거할 수 있으나 근관세척제의 작용을 막는 도말층의 무기성분을 제거하지 못한다. EDTA는 금속이온과 결합하여 킬레이트 화합물을 만들고 근관벽 표면을 탈회시켜 근관성형 후 생기는 도말층의 무기질을 제거하여 상아세관으로 깊숙이 침투한 미생물들에게 다른 약물이 도달할 수 있게 도와줄 수 있는 반면 유기물질을 제거하지 못한다. 클로르헥시딘은 양이온인 클로르헥시딘 분자가 미생물의 세포 표면에 부착하여 세포막의 투과도를 증가시킴으로써 살균을 하며 상아질에 흡수되어 수 일에서 수 주에 걸쳐 지속적으로 분자이온을 유리할 수 있으나 도말층 및 유기물질을 제거할 수 없다. 최근에도 MTAD, superoxidized water등이 근관세척제로 연구되고 있으나 기존에 사용해 온 차아염소산나트륨, 수산화칼슘과 같은 약제보다 여러 측면에서 더 효과적이거나 혹은 그 약제들을 대체할 수 있다고 말하기는 어려운 점이 있다. 다시 말해 지금까지 개발되어 온 근관세척제와 근관 내 첩약들은 각각 단독으로 사용하기에는 그 기능들이 불충분한 측면이 있다. 근관세척제는 항미생물 효과 외에도 괴사치수 용해, 윤향작용, 근관벽 젖음성 등 필요한 조건들이 있다.<sup>48</sup> 이러한 점들을 고려한다면 berberine을 단독으로 사용하는 것보다는 차아염소산나트륨과 병용해서 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Berberine의 NHGF 세포들에 대한 세포 독성 실험의 결과에 의하면 그람 양성 세균 종인 *E. faecalis*에 대한 항균능을 보이는 농도에서는 상당한 세포 독성이 있었다. 이상적인 근관세척제와 근관 내 첩약은 항균 능력이 우수하면서도 치근단 주위 조직에 있는 정상 세포에 대한 독성이 적어야 한다.<sup>49</sup> 따라서 이러한 관점에서 볼 때 berberine은 근관 내에 사용할 수 있는 항균 물질로서 적합하지 않다고 여겨질 수 있다. 반면 임상에서 가장 흔하게 사용하고 있는 차아염소산나트륨의 경우 세포 독성이 높은 물질이지만 세척 기구를 주의 깊게 사용한다면 차아염소산나트륨 용액이 근단공 바깥으로 주입되어 부작용이 발생하는 사례는 드물게 나타난다고 보고되었다.<sup>48,50</sup> 그러

므로 berberine도 주의 깊게 사용한다면 본 실험에서 사용한 berberine의 농도 중 *E. faecalis*에 대한 가장 높은 MBC 값인 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 사용이 가능하다고 생각한다.

한편 Berberine 용액 농도가 1000  $\mu\text{g/ml}$  일 때의 세포 생존율이 500  $\mu\text{g/ml}$  일 때보다 상당히 높게 나타난 원인은 MTT의 환원물질인 formazan 결정의 양이 많기 때문이 아니라 높은 농도로 사용된 berberine의 고유한 색이 반영된 것으로 보인다.

본 연구의 한계 내에서 근관세척제로 사용하는 berberine의 농도는 세포 독성을 감안하지 않는다면 1 mg/ml 내외가 적절할 것으로 보이나 기존에 행해진 Moussa 등의 연구에서 사용한 2 mg/ml와 차이가 있으므로 사용 농도에 대한 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 보인다. 또한 치근단 병소와 관련된 약리작용에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## V. 결 론

본 연구에서는 근관감염과 관련된 주요한 세균 종으로 알려진 *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, 및 *T. forsythia*에 대한 이소퀴놀린 알칼로이드인 berberine의 항균 효과와 정상 사람 치은점유모세포에 대한 세포독성을 평가하고 근관세척제 및 근관 내 침약으로 사용할 가능성에 대해 알아보았다. 그 결과는 다음과 같았다.

1. Berberine의 MIC는 그람 양성균인 *E. faecalis* KCTC 3206<sup>T</sup>과 자연형 *E. faecalis*에서 250 µg/ml을 나타냈다.
2. Berberine의 MIC는 그람 음성균인 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384<sup>T</sup>, *P. nigrescens* ATCC 33563<sup>T</sup>, *P. intermedia* ATCC 25611<sup>T</sup>, *T. forsythia* ATCC 43037<sup>T</sup>에서 12.5-50 µg/ml를 나타냈다.
3. 가장 높은 MBC는 2종의 자연형 *E. faecalis*에서 1,000 µg/ml였다.
4. Berberine의 정상 사람 점유모세포에 대한 MTT 분석법의 결과는 31.3 µg/ml 농도에서 67.2 %의 생존율을 보였고 62.5 µg/ml 이상의 농도에서는 60% 미만의 생존율을 나타냈다.

이상의 연구 결과에 따르면 berberine은 근관감염의 주요한 원인 균에 대해 충분한 항균능력이 있는 것으로 보인다. 그리고 berberine은 현재 사용하고 있는 차아염소산나트륨, 수산화칼슘 등의 경우와 마찬가지로 세포독성 보다 치료효과에 더 비중을 둔다면 근관감염에 사용하기에 적절할 것으로 생각한다.

## 참고문헌

1. Trope M. The vital tooth: its importance in the study and practice of endodontics. *Endod Topics* 2003;5:1
2. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 1974;18:269-296.
3. Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998;24:763-767.
4. Tik Tan B, Messer HH. The quality of apical canal preparation using hand and rotary instruments with specific criteria for enlargement based on initial apical file size. *J Endod* 2002;28:658-664.
5. Peters OA, Laib A, Göhring T, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod* 2001;27:1-6
6. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen : Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics* 2003;6:3-28.
7. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008;58:329-341.
8. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-428.
9. Vianna ME, Gomes BPF, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:79-84.
10. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009;42:288-302.

11. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229-231.
12. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J* 2006;32:112-115.
13. Kanisavaran ZM. Chlorhexidine gluconate in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008;58:247-257.
14. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodríguez E, Liébana-Ureña J, Espigares-García M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:e84-89.
15. Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:626-630.
16. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-398
17. Raad II, Fang X, Keutgen XM, Jiang Y, Sherertz R, Hachem R. The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:385-92.
18. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2003;29:400-403.
19. Ehrmann EH, Messer HH, Adams GG. The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics. *Int Endod J* 2003;36:868-875.
20. Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Doğramacı EJ, Steier L, De Figueiredo JAP. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int Endod J* 2011;44:792-799.
21. Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, Imbriani M, Visai



- L. Photoactivated disinfection(PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs* 2011;34:889-897.
22. Birdsall TC, Kelly GS. Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alt Med Rev* 1997;2:94-103.
  23. Sack RB, Froehlich JL. Berberine inhibits intestinal secretory response of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins. Infection and immunity. *Am Soc Microbiol* 1982;35:471-475.
  24. Cecil CE, Davis JM, Cech NB, Laster SM. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Int Immunopharmacol* 2011;11:1706-1714.
  25. Kosalec I, Gregurek B, Kremer D, Zovko M, Sanković K, Karlović K. Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine-analysis and antimicrobial activity. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25:145-150.
  26. Ghosh, AK, Bhattacharyya FK, Ghosh DK. Leishmania donovani: Amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp Parasitol* 1985;60:404-413.
  27. Sun Y, Xun K, Wang Y, Chen X. A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs *Anticancer Drugs* 2009;20:757-769.
  28. Küpeli E, Koşar M, Yeşilada E, Hüsnü K, Başer C. A comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci* 2002;72:645-657.
  29. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:1433-1437.
  30. Bhandari DK, Nath G, Ray AB, Tewari PV. Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark. *Pharm Biol* 2000;38:254-257.

31. Iwasa K, Lee DU, Kang SI, Wiegrebe W. Antimicrobial activity of 8-alkyl- and 8-phenyl-substituted berberines and their 12-bromo derivatives. *J Nat Prod* 1998;61:1150-1153.
32. Özok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJF, Wesselink PR, Crielaard W, Zaura E. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J* 2012;45:530-541.
33. Chavez de Paz L. Gram positive organisms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004;9:79-96.
34. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.
35. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315-320
36. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TH, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concept in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-98
37. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:396-400.
38. Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;Epub ahead of print
39. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and

- by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:211-215.
40. Cao H, Qi Z, Jiang H, Zhao J, Liu Z, Tang Z. Detection of *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in primary endodontic infections in a Chinese population. *Int Endod J* 2012;Epub ahead of print
  41. Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endod Topics* 2003;6:57-77.
  42. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, Kim HK, Lee YE, Choi NY. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med food* 2005;8:454-461.
  43. Moussa NMA, Xie Q, BeGole E, Johnson B, Wenckus C, Wu C. The antimicrobial efficacy of berberine versus sodium hypochlorite and chlorhexidine against *E. faecalis*. *J Endod* 2010;36:572 PR32.
  44. Hu JP, Takahashi N, Yamada T. Coptidis rhizoma inhibits growth and proteases of oral bacteria. *Oral Dis* 2000;6:297-302
  45. Ghosh AK, Bhattacharyya FK, Ghosh DK. Leishmania donovani: Amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp Parasitol* 1985;60:404-413.
  46. Sun D, Courtney HS, Beachey EH. Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1370-1374.
  47. Wu L-T, Tsou M-F, Ho C-C, Chuang J-Y, Kuo H-M, Chung J-G. Berberine inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in *Salmonella typhi*. *Curr Microbiol* 2005;51:255-261.
  48. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54:291-312.
  49. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod* 2003;29:654-657.

50. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation-literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-193.