



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](#)

Streptococcus mutans 에 대한
Curcuma xanthorrhiza 추출물의 광역학 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 현 중

Streptococcus mutans 에 대한
Curcuma xanthorrhiza 추출물의 광역학 효과

지도교수 김 백 일

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2016년 12월

연세대학교 대학원

치 의 학 과

이 현 중

이현중의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 백 일 인

심사위원 권 호 근 인

심사위원 정 승 화 인

연세대학교 대학원

2016 년 12 월

감사의 글

2010년 대학원 수업 첫 날 강력한 태풍 곤파스와 함께 시작했던 파란만장한 석사과정
이 2016년에 드디어 끝을 맺게 되었습니다. 그동안 개원도 하고 둘째도 낳고 충남서산
으로 이사도 하고 휴학도 2년을 딱 채우면서 예방치과학교실 역사상 최장수 석사학위생
이 되었습니다. 길었던 만큼 감사해야 할 일이 너무 많습니다.

우선은 포기하지 않고 끝까지 과정을 마칠 수 있도록 격려를 아끼지 않으시고 이끌어
주셨다는 표현으로는 부족함을 느끼게 해주신 지도교수 김백일 교수님께 깊은 감사를
드립니다. 학위과정뿐만이 아니라 학문과 인생을 대하는 태도를 가르쳐 주셨습니다.

학위 시작 할 때 저의 지도교수님이셨고 학장님이 되셔서 너무 자랑스러웠던 권호근 교
수님 늘 호방하고 유쾌한 모습으로 대해 주셨습니다. 인생의 큰 스승으로 모실 수 있게
되어 영광이었습니다. 심사위원이자 늘 앞에 서서 좋은 삶의 길을 뚜벅뚜벅 걷고 계신
정승화교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

저를 예방치과학교실로 이끌었고 여전히 훌륭한 멘토로서 애정을 아끼지 않는 조남역선
배님께 깊은 감사를 드립니다. 페이스절 괴로움에 빠졌을 때 용기를 주었던 김권수선배
님과 교실에 대한 무한애정을 보여주는 서동구선배님께도 감사드립니다. 따뜻한 이민형
선배님&임종원선배님 임상가로서 박사과정을 열심히 하시는 모습 늘 멋지게 생각합니다.
역대 의국장 정희인교수님, 강시묵박사님, 김보라박사님, 이은송교수님, 정은하선생님과
현재 구혜민의국장님까지 외래의국원 챙기느라 고생 많으셨고 특별히 더 고맙습니다.

병원에 좋은 제자들을 소개해주셨던 오혜영교수님 이제는 신성대교수님이신 맹유진교수님 서라벌대 황혜림교수님 첫 번째 대학원담당이었던 경북대 김영석교수님 연세대 한선영교수님, 청주대 민지현교수님 항상 병원 운영에 관한 조언을 아끼지 않는 전미경선생님 그리고 노처녀 시집보내는 기분이라고 진심으로 축하해주 기뻐해주는 우리 의국원들 사랑합니다. 교실에 오면 늘 생각나는 아현이에게도 감사를 전합니다.

늘 바쁜척하는 남편을 아빠를 이해해주고 사랑해주는 혜운이와 사랑하는 딸 은찬, 은솔이에게 고마움을 전합니다. 이제는 가족같은 우정을 나누게 된 시묵이에게 한 번 더 특별한 감사를 전합니다.

예방이라는 학문을 알게 되고 깊이 접하게 되어 앞으로 임상을 해나감에 있어 확고한 기준과 철학이 생겼습니다. 배운 바를 실천해나가는 교실원이 될 수 있도록 정진해나가도록 하겠습니다.

2016년 12월

이현중 올림

차 례

그림 차례	III
표 차례	IV
국문 초록	V
1. 서론	1
2. 연구 재료 및 방법	9
2.1. 세균 및 배양조건	9
2.2. 광민감제 농도에 따른 항균력 평가	10
2.3. 광조사 시간에 따른 항균력 평가	12
2.4. 통계분석	13
3. 연구 결과	14
3.1. 광조사 유무에 따른 <i>S. mutans</i> 에 대한 curcumin 농도별 항균력 ..	14
3.2. 광조사 유무에 따른 <i>S. mutans</i> 에 대한 xanthorrhiza 추출물 농도별 항균력	15

3.3. 광조사 유무에 따른 <i>S. mutans</i> 에 대한 curcumin과 xanthorrhiza 추출물 혼합 용액의 농도별 항균력	16
3.4. 광민감제에 따른 <i>S. mutans</i> 의 항균력	17
3.5. 광조사 시간에 따른 <i>S. mutans</i> 의 항균력	20
4. 고찰	22
5. 결론	26
6. 참고문헌	28
Abstract	32

그림 차례

Figure 1. (A) <i>S. mutans</i> establishes low localized pH via its surface-associated glucans and that low surface pH induces protective mechanisms for coping with acid-stress. The normal adaptive Acid Tolerance Responses (ATR) genes in WT are not induced when glucans are missing. (B) Illustration of how the lack of acid tolerance is likely to impact the overall persistence and growth of <i>S. mutans</i> within the community and (C) a model of how the virulence properties could be linked	2
Figure 2. Molecular structure of curcumin(A)and xanthorrhizol(B).....	4
Figure 3. Turbidity of photodynamic reaction solutions	10
Figure 4. Photodynamic inactivation of <i>S. mutans</i> by curcumin. The asterisk marks indicate significant differences (single(*):p<0.05, double(**):p<0.01, triple(***):p<0.001)	17
Figure 5. Photodynamic inactivation of <i>S. mutans</i> by xanthorrhiza extract. The asterisk marks indicate significant differences (single(*):p<0.05, double(**):p<0.01, triple(***):p<0.001)	18
Figure 6. Photodynamic inactivation of <i>S. mutans</i> by curcumin and xanthorrhiza extract. The asterisk marks indicate significant differences (single(*):p<0.05, double(**):p<0.01, triple(***):p<0.001)	19
Figure 7. Photodynamic inactivation of <i>S. mutans</i> in cell suspensions by three photosensitizers and irradiation with 405 nm light for 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, and 300 second	21

표 차례

Table 1. Historical application of xanthorrhizol. Adapted from Oon et al. Cancer Cell Int 2015;15:100	7
Table 2. Mean count of <i>S. mutans</i> viable cells under light on and off using curcumin as a photosensitizer	14
Table 3. Mean count of <i>S. mutans</i> viable cells under light on and off using xanthorrhiza extract as a photosensitizer	15
Table 4. Mean count of <i>S. mutans</i> viable cells under light on and off using curcumin as a photosensitizer	16

국문초록

Streptococcus mutans 에 대한 *Curcuma xanthorrhiza* 추출물의 광역학 효과

<지도교수 김백일>

연세대학교 대학원 치의학과

이 현 중

Streptococcus mutans 는 구강내 치태가 성장하는 과정에서 불용성 글루칸을 합성하여 다양한 구강내 세균이 부착할 수 있는 구조를 형성하고, 유기산을 분비하여 치아의 탈회를 야기한다. 따라서 *S. mutans* 를 비롯한 구강내 다양한 세균을 효과적으로 관리해야 치아우식증을 예방할 수 있다. 자연에 존재하는 다양한 식물은 다양한 생리작용을 하는 성분이 포함되어 있으며 세균의 침투를 막는 항균성분도 포함하고 있다.

강황과 식물인 *Curcuma* 에는 항염증, 항산화, 항균 등을 나타내는 curcumin, xanthorrhizol 등의 성분이 있으며 이미 구강내 세균에 대한

항균력이 있다는 사실이 보고되었다. 한편 최근 치의학 분야에서는 광민감제와 광조사를 통한 항균, 항염, 항암 치료에 활용하는 다양한 시도가 이루어지고 있다. Curcumin 은 자체로도 강력한 항균력을 나타내지만, 광조사를 할 경우 세균의 최소억제농도가 낮아지는 효과가 있지만 xanthorrhiza 추출물이 광민감제로 작용하는지에 대한 연구는 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 천연물 유래 물질인 xanthorrhiza 추출물과 curcumin 을 이용하여 광조사에 따른 광역학 반응에 의해 *S. mutans* 을 효과적으로 억제할 있는지 평가하고 광조사 시간에 따른 항균력의 차이를 조사하였다.

본 연구에서는 *S. mutans* ATCC 25175 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 광민감제로는 curcumin 과 xanthorrhiza 추출물 분말을 1 mg/ml 농도로 dimethyl sulfoxide 용매에 녹여 원액을 준비하였고, 실험에는 원액을 희석하여 10, 100, 1000, 10000 ng/ml 농도로 준비하여 사용하였다. 광조사는 405 nm LED 가 내장된 Qraycam 장비를 이용하였고 이때, 광밀도는 28.8 mW/cm^2 였다. 광조사 시간에 따른 차이를 확인하기 위해 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300 초간 광조사 후 광역학 반응이 일어난 용액을 brain heart infusion 고체배지에 도말하여 37°C , 10% CO_2 배양기에서 24시간 배양 후 생균을 평가하였다. 광조사 유무에 따른 균간 생균수의 차이는 독립표본 T-검정을

하였고, 광민감제 농도에 따른 생균수를 비교하기 위해 일원분산분석을 통계분석프로그램인 SPSS 23.0을 사용하였다.

생균수를 평가한 결과 xanthorrhiza 추출물은 405 nm 광원 하에서 광역학 반응을 유도하여 100 ng/ml 이상의 농도에서 *S. mutans* 의 성장을 억제하였다. Curcumin 은 보다 저농도인 10 ng/ml 에서 성장을 억제하였지만, 물에 대한 용해도가 낮아 10000 ng/ml 에서는 오히려 효과가 감소되었다. Xanthorrhiza 추출물과 curcumin 을 혼합한 경우 1000 ng/ml 농도에서는 *S. mutans* 를 모두 사멸시켰지만, 10000 ng/ml 에서는 curcumin 의 낮은 용해도에 의해 효과가 감소하였다. 또한 본 연구에서 1000 ng/ml 농도의 광민감제를 사용한 경우 curcumin 단독 및 xanthorrhiza-curcumin 혼합물은 30초 광조사만으로 *S. mutans* 의 성장을 완전히 억제였고, xanthorrhiza 추출물의 경우 60초 이상의 광조사에서 세균의 성장을 완전히 억제하였다.

결론적으로 xanthorrhiza 추출물은 405 nm 광원과 함께 적용할 경우 물질을 단독으로 사용할 경우보다 *S. mutans*에 대한 최소억제농도가 더욱 낮아지며 curcumin과 혼용하여 보다 강력한 항균력을 나타낼 수 있어 향후 임상적으로도 활용이 가능할 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 광민감제, 광역학치료, 구강 세균, 구강 질환, 천연추출물, *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans 에 대한
Curcuma xanthorrhiza 추출물의 광역학 효과

<지도교수 김 백 일>

연세대학교 대학원 치의학과

이 현 중

1. 서론

치아 표면에서 발견되는 치아우식증의 주요 병원성 요인은 streptococci 로 이들 중 *Streptococcus mutans*가 가장 널리 알려져 있다. 특히 *S. mutans*는 구강내 치태가 성장하는 과정에서 불용성 글루칸(insoluble glucan)을 합성하여 다양한 구강내 세균이 부착할 수 있는 구조를 형성함은 물론이고, 유기산을 분비하여 주변 환경의 pH를 낮추게 되어 치아의 탈회(demineralization)을 야기한다(Figure 1) (Arzmi et al., 2016; L. Guo et al., 2015).

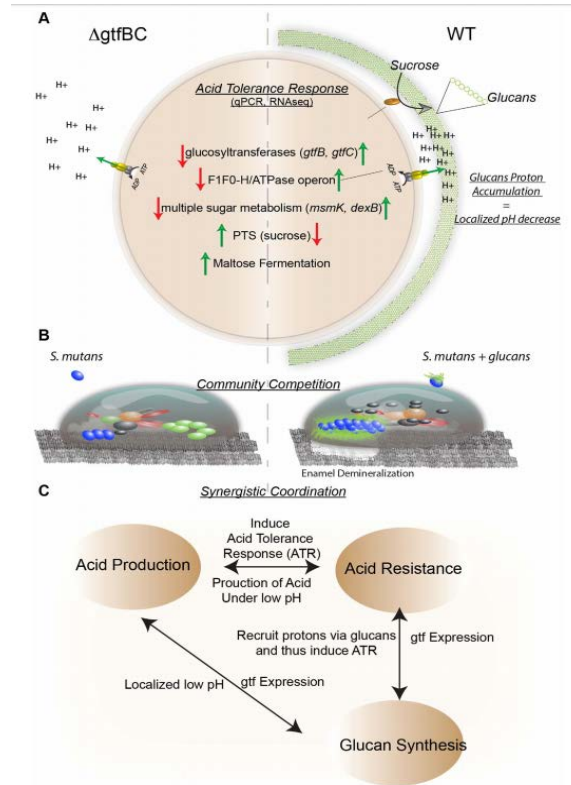


Fig 8. (A) *S. mutans* establishes low localized pH via its surface-associated glucans and that low surface pH induces protective mechanisms for coping with acid-stress. The normal adaptive Acid Tolerance Responses (ATR) genes in WT are not induced when glucans are missing. (B) Illustration of how the lack of acid tolerance is likely to impact the overall persistence and growth of *S. mutans* within the community and (C) a model of how the virulence properties could be linked. Adapted from Guo et al. Scientific Reports | 5:18015(Lihong Guo et al., 2015)

물론 치아우식증은 특정 균만에 의해 야기되는 단순한 구강질환이 아니라 non-Mutans streptococci와 *Actinomyces* sp.를 비롯하여 Lactobacilli 등 다양한 미생물이 유기적으로 관여하고 있지만(Takahashi and Nyvad, 2008), 여전히 *S. mutans*는 치아우식증의 예방을 위해 효과적으로 조절하거나 바이오 필름의 성장을 억제하기 위한 주요한 목표로 많은 연구가 진행되고 있다(Chen et al., 2016; Hasan et al., 2015; Nijampatnam et al., 2016; Vahid-Dastjerdi et al., 2016). 이러한 이유로 추가적인 조절법 개발이 필요하다.

치아우식증을 예방하기 위해서는 설탕으로 대표되는 대사성 탄수화물의 섭취를 제한하고 구강의 위생상태를 청결하게 유지하는 것이 중요하다. 특히 구강 위생 상태를 청결하게 유지하기 위한 방법으로는 기계적으로 칫솔질을 하여 음식물의 잔해와 치아 표면에 부착된 바이오 필름을 효과적으로 제거하거나 항균제재를 이용하여 미생물의 활성을 낮추는 방법이 있다(Hilgert et al., 2015; Kumar et al., 2016; Rolim et al., 2012; Steinberg and Friedman, 2016). 그러나 이들 방법 중 칫솔질은 지나친 힘으로 사용할 때는 구강 점막에 지나친 자극을 줘서 손상을 입히게 되기도 하고 항균물질의 오남용 또는 자연발생적으로 존재하는 항생제 내성 균주를 조절하기에 한계가 있다(Pereira et al., 2011; Wood et al., 2006).

인류는 오래 전부터 약용 식물을 이용하여 다양한 질병을 치유하거나 예방하였다. 최근 건강관리에 대한 관심이 고조되고 생활습관이 변화됨에 따라

삶의 질 향상을 위한 요구가 크게 증가하고 있으며, 더욱이 의약품의 안전성 등에 대한 관심이 고조되고 있다. 이에 과학기술이 급격히 발전한 오늘날에도 여전히 인류는 다양한 천연자원으로부터 새로운 물질을 찾기 위해 많은 노력을 하고 있는 실정이다. 더욱이 천연물신약 연구개발은 신약 1건 개발시 전세계적으로 연간 1조원~2조원의 매출과 매출의 20-50%의 순이익 창출이 가능한 높은 투자 효율성을 가진 고부가가치 산업이다(국내외 천연물의약품 연구개발 동향, 2006).

*Curcuma xanthorrhiza*라는 인도 강황 식물의 뿌리에서 추출된 xanthorrhizol은 항균, 항염, 항산화, 고혈당억제, 항고혈압, 항혈소판 등 다양한 생리활성 작용을 나타내는 것으로 보고되었다(Table 1)(Oon et al., 2015). 그 중 항균력에 대한 연구가 많이 되었는데, 특히 *S. mutans*에 대한 항균력이 특이적으로 높다고 보고되었다(Hwang et al., 2000). 하지만 xanthorrhizol은 물에 대한 용해도가 낮아 다양한 형태로 사용할 수 없는 단점이 있으며 또한 여러 단계의 정제를 거쳐야 하기 때문에 수율이 낮고 가격이 매우 높다는 한계가 있다.

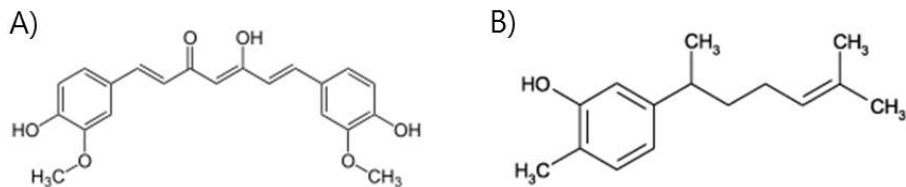


Fig 9. Molecular structure of curcumin(A)and xanthorrhizol(B)

한편 치의학 분야에서는 광역학 치료 방법이 소개되었고 임상적 활용 가능성이 높다는 사실이 알려졌다(Gursoy et al., 2013). 이미 치주관련 균주와 우식 유발 균주에 대한 효과가 보고되었고(Komerik et al., 2003; Paulino et al., 2005), 최근 관심이 증가하고 있는 peri-implantitis와 관련된 균주의 억제 효과 또한 보고되었다(Shibli et al., 2003). 하지만 이들 문헌들에서 사용한 빛은 대부분 500 nm 이상의 장파장을 사용한 한계가 있다. 빛은 파장이 길어질수록 비록 침투깊이는 깊어지지만, 반대로 빛에너지는 약해지기 때문에 실제 임상적인 항균효과는 실험실 상에서 연구한 효과보다 낮을 것으로 예상된다.

최근 xanthorrhizol과 분자구조가 유사하고 역시 항균력을 나타내는 curcumin이라는 물질을 이용하여 새로운 광민감제로 사용할 수 있다는 보고가 있었다(Araujo et al., 2012). Curcumin 또한 curcuma longa라는 식물에서 추출한 천연물질로 이미 오랫동안 사용이 되어왔으며 물에 대한 용해도가 매우 낮다. 하지만 빛을 이용하여 광조사할 경우 낮은 농도를 적용하여도 항균력이 크게 증가하는 것을 보고되었고(Araujo et al., 2012), 더욱이 Cheah 등은 xanthorrhizol과 curcumin을 함께 사용할 경우 human breast cancer 세포의 성장 억제를 크게 향상시킬 수 있음을 보고하였다(Cheah et al., 2009). 하지만 아직 xanthorrhizol이 광민감제로써 작용을 할 수 있는지 연구된 바는 없으며, 또한 구강 미생물에 대해서 xanthorrhizol과 curcumin의

상승효과가 보고된 바도 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 천연물 유래 물질인 xanthorrhiza 추출물과 curcumin을 이용하여 광조사에 따른 광역학 반응에 의해 치아우식증의 주요 병원성인 *S. mutans*을 효과적으로 억제할 수 있는 최적의 농도를 탐색하고 광조사 시간에 따른 항균력의 차이를 조사하였다.

Table 2. Historical application of xanthorrhizol. Adapted from Oon et al. *Cancer Cell Int* 2015;15:100(Oon et al., 2015).

Pharmacology	Description
Antimicrobial	<p>Antibacterial</p> <p><i>Actinomyces viscosus, Porphyromona gingivalis, Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Propionibacterium acnes</i></p> <p>Anticandidal</p> <p><i>Candida albicans, C. glabrata, C. guilliermondii, C. parapsilosis</i></p> <p>Antifungal</p> <p><i>Malassezia species, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, Fusarium oxysporum, Rhizopus oryzae, Trichophyton mentagrophtes</i></p>
Anti-inflammatory	In vitro reduced COX-2, iNOS, TNF- α and IL-6 levels; in vivo counteracted the effect of TPA-induced ODC, COX-2 and iNOS activation in mouse skin, and prevented I κ B α degradation; blocked the neurogenic and inflammatory pain response in the formalin induced pain test in rats
Antioxidant	Suppressed H ₂ O ₂ -induced lipid peroxidation in rat brain homogenates, glutamate-induced neurotoxicity and ROS production; inhibited human LDL peroxidation

Table 1. Historical application of xanthorrhizol. (Continue)

Pharmacoactivity	Description
Antihyperglycemic	Reduced the levels of insulin, glucose, FFA, TG in serum; reduced the size of epididymal fat pad and adipocyte; decreased the production of TNF- α , IL-6, IL-1 β and CRP in adipose tissue, liver and muscle
Antihypertensive	Calcium antagonistic activity in rat uterus and thoracic aorta
Antiplatelet	Inhibited platelet aggregation stimulated by arachidonic acid, collagen and ADP
Nephroprotective & hepatoprotective	Attenuated JNKs phosphorylation involved in MAPK signaling; inactivated NF-kB, AP-1; downregulated COX-2 and iNOS, reduced blood GPT and GOT levels
Estrogenic & anti-estrogenic	Upregulated pS2 and promoted EREs in MCF-7 cells; acted as partial antagonist hER α in T47D cells

2. 연구 재료 및 방법

2.1. 세균 및 배양조건

본 연구에서는 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 먼저 순수배양을 하기 위해 분양 받은 균주를 brain heart infusion(BHI, Difco Co, USA) 고체배지에서 48 시간 동안 10% CO₂ 배양기(37℃)에서 배양한 후 독립된 단일 집락을 백금으로 선별하여 BHI 액체배지에 접종하고 24 시간 배양하였다. 이후 세균 배양액을 멸균 처리된 80% glycerol 용액과 1:1 로 혼합하여 밀봉한 후 -80℃에 보관하여 실험에 이용하였다.

2.2. 광민감제 농도에 따른 항균력 평가

본 연구에서는 광역학 반응에 따른 구강 미생물의 사멸 효과를 탐색하기 위해 광민감제로써 curcumin(Sigma aldrich Co, MO, USA)과 curcuma xanthorrhiza 추출물(Gehrlicher Pharmazeutische, Germany)을 각각 또는 혼합(1:1)하여 사용하였다. 광민감제의 농도에 따른 항균력을 비교하기 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 1 mg/ml의 농도가 되도록 stock 용액을 준비하여 실험시 사용하였다. 실험에 사용한 광민감제의 농도는 10, 100, 1000, 10000 ng/ml 이 되도록 stock 용액을 증류수에 희석하여 사용하였고, 이때, 모든 실험용액의 DMSO의 함량은 1% 이하가 되도록 하였다(Figure3).

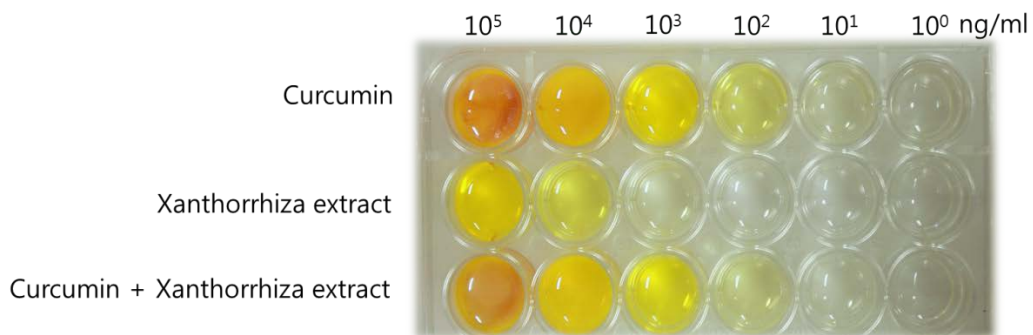


Fig 10. Turbidity of photodynamic reaction solutions

각 농도 별로 제조한 광민감제 용액 1.8 ml 에 2일간 배양된 *S. mutans* 배양액 0.2 ml 를 혼합하여 세균의 최종농도가 1X10⁶ CFU/ml 가 되도록 하였

다. 광역학 반응을 유도하기 위해 본 연구에서는 405 nm 파장의 LED 가 장착된 Qraycam(All in one bio, Korea)을 이용하여 5분간 광조사하고 총 25.3 J($84.5 \text{ mW} \times 300 \text{ s}$)의 빛에너지를 조사하였다. 광조사시 주변 빛의 영향을 최소화하기 위해 클린벤치의 형광등을 끄고 암조건을 유지하였다. 반응이 완료된 용액 100 μm 를 BHI 고체배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48 시간 배양 후 생균수를 측정하였고, 모든 실험은 총 3 번 반복하였다.

2.3. 광조사 시간에 따른 항균력 평가

각 광민감제에 따른 광역학 반응 속도를 확인하기 위해 광조사 시간을 달리하여 비교하였다. 이 때 모든 광민감제의 농도는 1000 ng/ml 를 사용하였고, 광조사 시간을 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300 sec 으로 달리 적용하여 항균력을 확인하였다. 항균력은 1000 ng/ml 의 농도로 제조된 광민감제 1.8 ml 에 2일간 배양된 *S. mutans* 배양액 0.2 ml 를 혼합하여 시간 별로 광조사하였고, 광 조사가 완료된 용액 100 μ m를 BHI 고체배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48 시간 배양 후 평가하였다.

2.4. 통계분석

광조사 유무에 따른 균간 생균수의 차이는 독립표본 T-검정을 하였고, 광민감제 농도에 따른 생균수를 비교하기 위해 일원분산분석(One-way ANOVA)을 행하였다. 모든 자료의 분석은 SPSS 23.0(IBM, USA)을 사용하여 유의수준 0.05 에서 수행하였다.

3. 연구 결과

3.1. 광조사 유무에 따른 *S. mutans* 에 대한 curcumin 농도별 항균력

Curcumin 물질을 통해 유도된 광역학 반응에 의한 *S. mutans* 의 항균력은 10–1000 ng/ml 의 저농도부터 접종한 모든 균을 사멸하는 것이 관찰되었다. 특히 가장 낮은 농도였던 10 ng/ml 에서도 405 nm 의 광원을 함께 5분간 조사한 결과 모든 균이 사멸하였다. 하지만 10000 ng/ml 의 고농도에서는 오히려 대조군과 차이가 없을 정도로 항균력이 상실되었다.

Table 2. Mean count of *S. mutans* viable cells under light on and off using curcumin as a photosensitizer.
Unit: Log₁₀ (CFU/ml)

Concentration	405 nm Light Off	405 nm Light On	P [†]
0 ng/ml	6.58±0.11 ^a	6.27±0.22 ^A	0.116
10 ng/ml	6.29±0.47 ^a	0.0±0.0 ^B	0.002
10 ² ng/ml	6.41±0.45 ^a	0.0±0.0 ^B	0.032
10 ³ ng/ml	6.46±0.39 ^a	0.0±0.0 ^B	0.027
10 ⁴ ng/ml	6.37±0.31 ^a	5.67±0.29 ^C	0.047

Data are expressed as mean±SD.

[†] Student's independent t-test was used to calculate the significant coefficient.

Different letters indicate significant differences between groups (Bonferroni, $p < 0.05$).

3.2. 광조사 유무에 따른 *S. mutans* 에 대한 xanthorrhiza 추출물 농도별 항균력

Xanthorrhiza 추출물은 광조사가 없는 경우엔 10000 ng/ml 의 고농도에 서는 *S. mutans* 의 성장을 억제하는 효과가 관찰되었지만, 그 이하의 농도에 선 항균력이 없었다. 하지만 광조사를 통해 유도된 광역학 반응에 의한 최소 억제농도(MIC)는 100 ng/ml 이었으며, 1000-10000 ng/ml 의 경우엔 강력한 항균력을 나타냈다.

Table 3. Mean count of *S. mutans* viable cells under light on and off using xanthorrhiza extract as a photosensitizer. Unit: Log₁₀ (CFU/ml)

Concentration	405 nm Light Off	405 nm Light On	P [†]
0 ng/ml	6.52±0.22 ^a	6.29±0.17 ^A	0.249
10 ng/ml	6.51±0.23 ^a	6.33±0.07 ^A	0.311
² 10 ng/ml	6.45±0.25 ^a	5.36±0.21 ^B	0.005
³ 10 ng/ml	6.27±0.32 ^a	0.33±0.58 ^C	0.0004
⁴ 10 ng/ml	4.91±0.49 ^b	0.0±0.0 ^C	0.03

Data are expressed as mean±SD.

[†] Student's independent t-test was used to calculate the significant coefficient.

Different letters indicate significant differences between groups (Bonferroni, $p < 0.05$).

3.3. 광조사 유무에 따른 *S. mutans* 에 대한 curcumin 과 xanthorrhiza
추출물 혼합 용액의 농도별 항균력

Curcumin 과 xanthorrhiza 추출물을 1:1로 혼합한 경우 광조사가 없는
상황에서도 10000ng/ml 의 고농도에서 항균력이 관찰되었고, 광조사를 한 경
우 최소억제농도는 10 ng/ml 였다. 하지만 curcumin 단독 사용한 경우와 유
사하게 10000ng/ml 의 고농도에서는 오히려 항균력이 감소되는 경향이 확인
되었다.

Table 4. Mean count of *S. mutans* viable cells under light on and off using curcumin and
xanthorrhiza extract as a photosensitizer. Unit: Log₁₀ (CFU/ml)

Concentration	405 nm Light Off	405 nm Light On	P [†]
0 ng/ml	6.59±0.09 ^a	6.27±0.16 ^A	0.054
10 ng/ml	6.39±0.36 ^a	0.57±0.98 ^B	0.005
² 10 ng/ml	6.40±0.41 ^a	0.0±0.0 ^B	0.029
³ 10 ng/ml	6.27±0.36 ^a	0.0±0.0 ^B	0.026
⁴ 10 ng/ml	5.01±0.46 ^b	3.47±0.42 ^C	0.013

Data are expressed as mean±SD.

[†] Student's independent t-test was used to calculate the significant coefficient.

Different letters indicate significant differences between groups (Bonferroni, $p < 0.05$).

3.4. 광민감체에 따른 *S. mutans*의 항균력 비교

Curcumin 과 xanthorrhiza 추출물 그리고 두 광민감체의 혼합물의 광역학 반응에 의한 *S. mutans* 에 대한 항균력은 10-1000 ng/ml 농도에서는 curcumin 과 curcumin-xanthorrhiza 혼합물이, 10000 ng/ml 이상의 고농도에서는 xanthorrhiza 추출물이 *S. mutans* 의 성장을 효과적으로 억제하였다. 또한 두 가지 물질이 모두 효과적으로 활성을 나타낼 수 있는 농도는 1000 ng/ml 였다.

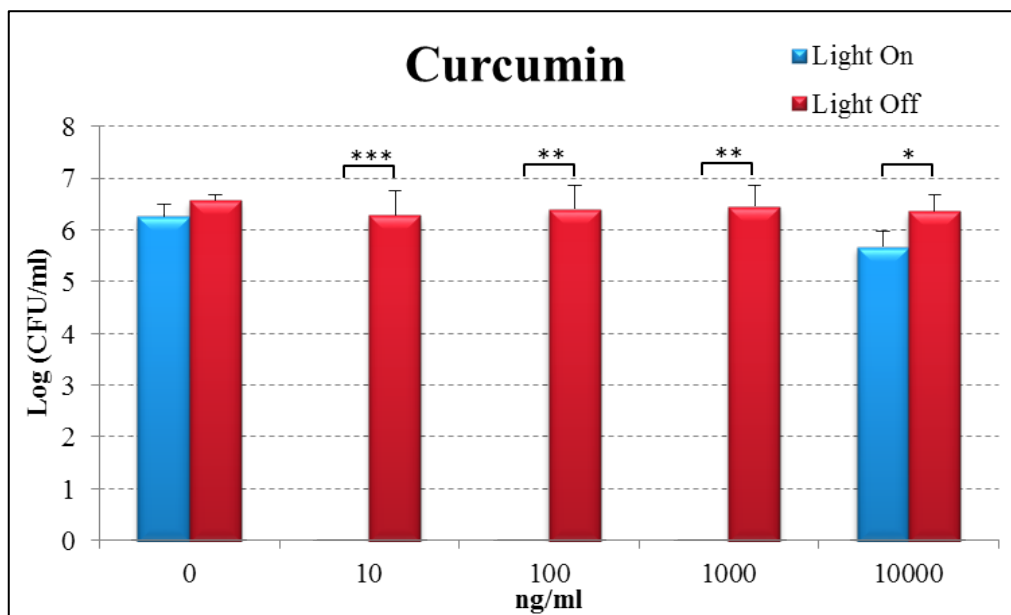


Fig 11. Photodynamic inactivation of *S. mutans* by curcumin. The asterisk marks indicate significant differences (single(*): $p < 0.05$, double(**): $p < 0.01$, triple(***): $p < 0.001$)

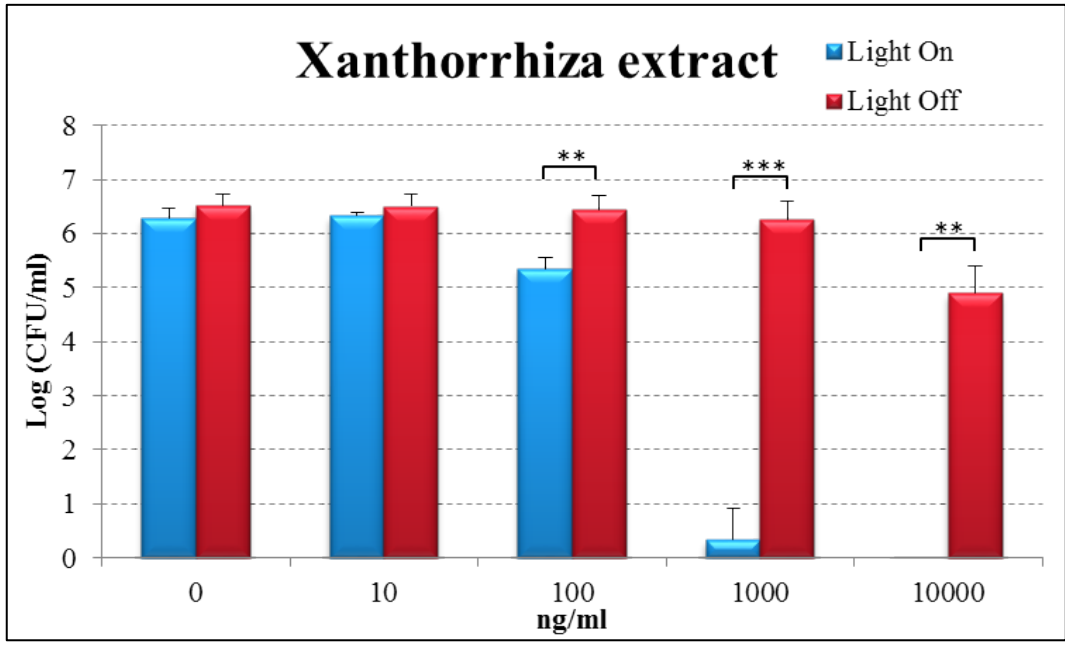


Fig 12. Photodynamic inactivation of *S. mutans* by xanthorrhiza extract. The asterisk marks indicate significant differences (single(*): $p < 0.05$, double(**): $p < 0.01$, triple(***): $p < 0.001$)

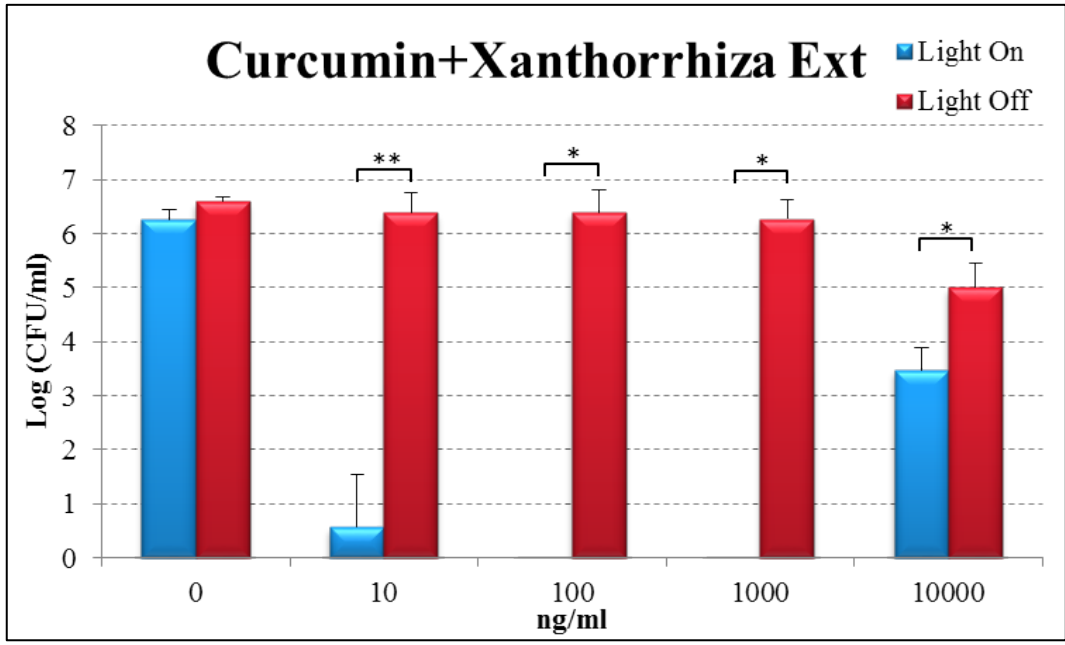


Fig 13. Photodynamic inactivation of *S. mutans* by curcumin and xanthorrhiza extract. The asterisk marks indicate significant differences (single(*): $p < 0.05$, double(**): $p < 0.01$, triple(***): $p < 0.001$)

3.5. 광조사 시간에 따른 *S. mutans* 에 대한 항균력

광조사 시간을 달리 적용하여 *S. mutans* 의 성장 저해 효과를 관찰한 결과 curcumin 과 curcumin 및 xanthorrhiza 혼합물은 30 초 광조사 조건에서 *S. mutans* 를 사멸시켰지만, xanthorrhiza 추출물 단독 사용시에는 사멸되지 않았다. 즉, curcumin 또는 curcumin 과 xanthorrhiza 혼합물은 약 2.53J (84.5 mW X 30 sec) 이상의 빛 에너지에 의해 광역학 반응이 유도되는 것으로 보인다. 한편 curcumin, xanthorrhiza 추출물 그리고 curcumin 과 xanthorrhiza 혼합물 모든 조건에서 동일하게 1분간의 광조사만으로도 *S. mutans* 는 효과적으로 사멸하는 것으로 확인되었다.

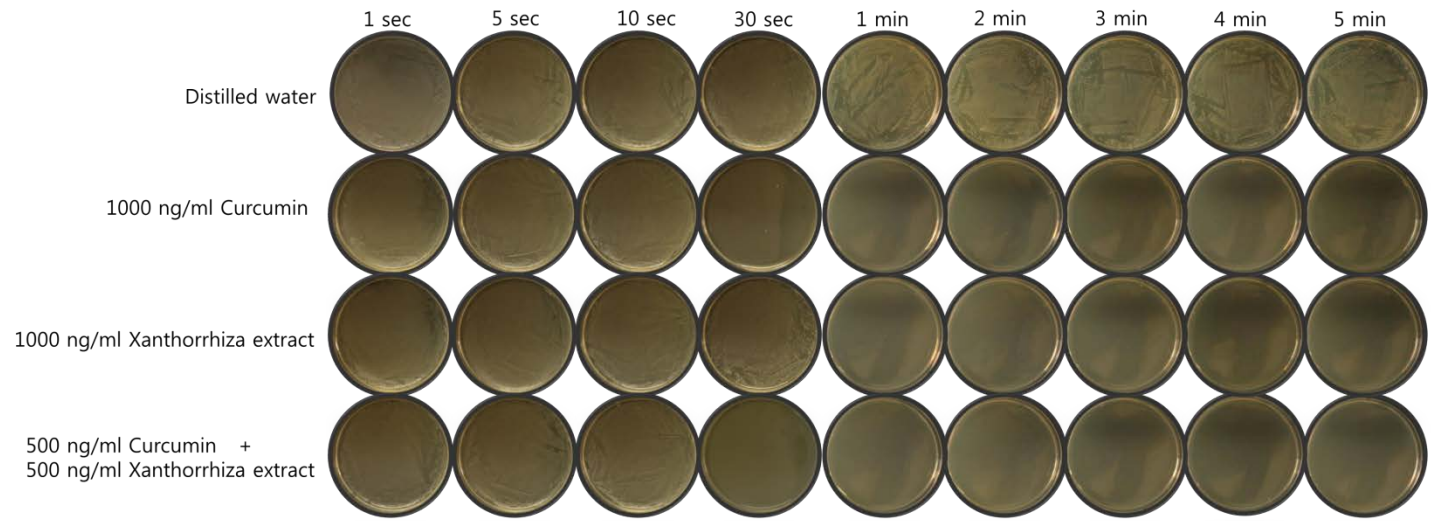


Fig 14. Photodynamic inactivation of *S. mutans* in cell suspensions by photosensitizers and irradiation with 405 nm light for 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, and 300 second.

4. 고찰

고대로부터 의술은 약초와 항상 결부되어 펼쳐져 왔다. 약초라는 의미로 사용되는 ‘허브’ 는 푸른 풀을 의미하는 라틴어 ‘허바(Herba)’ 에 어원을 두고 있으며, 고대국가에서는 향과 약초라는 뜻으로 이 말을 썼던 것이 현대에 와서는 ‘잎이나 줄기가 식용과 약용으로 쓰이거나 향과 향미로 이용되는 식물’ 을 ‘허브’ 로 정의한다. Eucalyptol, thymol 등의 천연물질과 유사하게 강황과의 식물에서 추출된 curcumin 과 xanthorrhizol 은 구강 세균에 항균력이 있다고 알려져 있다(Hwang et al., 2000; Najah A. Mohammed, 2015; Oon et al., 2015). 특히 xanthorrhizol 은 *S. mutans* 에 대한 minimum inhibitory concentration(MIC)가 2 μ g/ml 로 특이적으로 항균력이 높다고 알려져 구강 건강 관리를 위한 약용 물질로 가능성을 나타내었다(Hwang et al., 2000).

최근 Araujo 등은 curcumin 이 새로운 광민감제로서 광역학 반응을 나타낼 수 있음을 보고하였다(Araujo et al., 2012). 특히 450 nm 의 광원을 이용한 경우 *S. mutans* 에 대한 항균력은 1.5 g/L 에서 99.99%이상을 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서도 curcumin 은 *S. mutans* 에 대하여 405 nm 광원을 조사한 경우 항균력을 보였다. 하지만 본 연구에서는 10 ng/ml (=0.01 ppm)의 저농도에서도 항균력을 나타내어 선행연구에 비해 더 강력한 항균력

이 유도되었음을 추정할 수 있다. 하지만 선행연구와 유사하게 본 연구에서도 부유성 세균만을 대상으로 평가하였기 때문에 임상적으로 유용한 농도를 찾기 위해 추가적인 연구를 수행해야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 xanthorrhizol 이 함유된 xanthorrhiza 추출물의 광민감제로서의 가능성을 확인하였다. xanthorrhizol 은 curcumin 과 유사한 분자구조를 가지고 있지만, 분자량이 작아 실제 치태의 복잡한 구조에 깊숙이 침투할 수 있는 가능성이 있다(Rukayadi and Hwang, 2006). 비록 본 연구에서 curcumin 에 비해 xanthorrhiz 추출물이 항균력을 나타내는 농도가 높았지만, 10000 ng/ml 이상의 고농도에서는 오히려 curcumin 보다 효과가 뛰어났다. 이것은 아마도 고농도의 상태에서 curcumin 의 용해도가 xanthorrhizol 에 비해 낮기 때문에 나타난 현상으로 사료된다. 실제 실험상에서 10000 ng/ml 의 용액을 살펴보면 curcumin 은 불투명하게 보이는 반면, xanthorrhiza 추출물은 투명하게 보인다. 즉, xanthorrhiza 추출물의 용해도가 높음을 알 수 있다. 또한 xanthorrhiza 추출물은 100% xanthorrhizol 용액이 아니기 때문에 curcumin 에 비해 저농도에서 항균력이 나타나지 않은 것으로 예상된다. 만약 본 연구에서 사용한 추출물을 더욱 정제하여 순도가 높은 xanthorrhizol 용액을 준비하여 실험에 적용하게 된다면 curcumin 과 유사하거나 더욱 낮은 농도에서도 항균력을 나타낼 수 있을 것이다.

한편 Cheah 등은 xanthorrhizol 과 curcumin 을 혼합하여 human breast cancer cell 의 성장 억제력이 상승한다는 사실을 보고하였다. 특히 5 μ g/ml 의 농도에서 xanthorrhizol 단독 사용한 경우(5%)에 비해 curcumin 과 혼합하여 적용한 경우(40%)로 세포자살율이 8배 가량 상승하였다(Cheah et al., 2009). 본 연구에서도 이와 유사하게 10 ng/ml 의 농도에서 xanthorrhiza 추출물 단독 사용에 비해 curcumin 과 혼합하여 적용한 경우 *S. mutans* 에 대한 항균력이 크게 상승함을 알 수 있었다. 따라서 두 물질의 혼합사용을 통해 상승작용(synergy effect)이 일어남을 확인하였다. 비록 본 연구에서는 구강 유해균 중 *S. mutans* 만을 대상으로 하였지만, 이와 같은 두 물질의 상승작용은 구강내 다양한 균종에 대한 항균작용 가능할 것이라는 예상을 할 수 있으며, 또한 human breast cancer cell 과 같은 암세포의 억제를 위해서 두 물질의 혼합물을 적용하고 여기에 광조사까지 적용하면 더욱 효과적인 조절이 가능할 것으로 예상된다. 특히 본 연구에서는 5분이라는 광조사 시간을 통해 매우 적은 농도만으로도 *S. mutans* 를 효과적인 저해를 나타낼 수 있기 때문에 정상세포에 대한 부작용이 줄어들 것으로 예상된다. 더욱이 1000 ng/ml 의 농도를 적용할 경우 1분이라는 짧은 광조사만으로도 효과적으로 *S. mutans* 가 억제 됨을 확인하였기 때문에 임상적으로도 활용 가능성이 높을 것으로 예상된다.

비록 본 연구에서는 치아우식증과 관련이 높은 *S. mutans*만을 대상으로

평가한 한계가 있지만, *Actinomyces*나 *Lactobasillus* 등 우식유발균을 효과적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라 나아가 치주질환 관련 균주에 적용하여도 유사한 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 한편 앞서 기술한 바와 같이 본 연구에서는 부유성 상태의 균주만을 평가하여 임상적인 유효성을 입증할 수 없다. 따라서 biofilm 모델이나 동물 모델을 이용하여 보다 실제 구강 상태와 유사한 경우에서 효과를 확인하고 적절한 농도를 탐색하여 실제 임상에서의 효과와 적용법을 마련할 필요가 있을 것이다. 또한 김 등은(Kim, 2011) 계면활성제 sodium lauryl sulfate, sarcosinate, taurate를 이용하여 xanthorrhizol의 가용화를 증가시킬 수 있음을 보고하였다. 따라서 curcumin과 xanthorrhiza 추출물 또한 가용화를 높일 수 있는 방법을 함께 고려하여 광역학 반응을 유도하는 연구도 필요할 것으로 사료된다.

5. 결론

식물 유래 천연물질인 xanthorrhiza 추출물의 광민감제로서의 기능을 확인하기 위해 치아우식증의 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 항균력을 평가한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Xanthorrhizol을 함유한 xanthorrhiza 추출물은 5분간 405 nm 광원 하에서 광역학 반응을 나타내며 이를 통해 *S. mutans*를 100 ng/ml 이상의 농도에서 성장을 억제할 수 있다.
2. Curcumin은 5분간 405 nm 광원에 의해 10 ng/ml의 저농도에서도 *S. mutans*를 효과적으로 억제하였지만, 증류수에 대한 용해도가 낮아 10000 ng/ml 이상에서는 광역학 반응이 유도되지 않았다.
3. Xanthorrhiza 추출물과 curcumin을 혼합한 경우 *S. mutans*에 대한 항균력은 상승하였지만, 10000 ng/ml 이상의 농도에서는 curcumin의 낮은 용해도로 인해 광역학 반응이 저해되었다
4. 3가지 조건의 광민감제는 1000 ng/ml의 농도에서 1분 이내의 광 조사만으로도 *S. mutans* 균을 효과적으로 사멸시킬 수 있었다.

이상의 결과에 따라 xanthorriza 추출물은 405 nm 광원과 함께 적용할 경우 기존 MIC보다 낮은 농도에서도 *S. mutans*의 성장을 효과적으로 억제할 수 있다. 따라서 향후 바이오필름 연구 및 임상시험을 통해 임상에서 우식증 예방 및 치료에 대한 가능성을 조사해야 할 것으로 사료된다.

6. 참고문헌

- Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME: Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg* 30(7): 393-399, 2012.
- Arzmi MH, Alnuaimi AD, Dashper S, Cirillo N, Reynolds EC, McCullough M: Polymicrobial biofilm formation by *Candida albicans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus mutans* is *Candida albicans* strain and medium dependent. *Med Mycol* 54(8): 856-864, 2016.
- Cheah YH, Nordin FJ, Sarip R, Tee TT, Azimahtol HL, Sirat HM, et al.: Combined xanthorrhizol-curcumin exhibits synergistic growth inhibitory activity via apoptosis induction in human breast cancer cells MDA-MB-231. *Cancer Cell Int* 9: 1, 2009.
- Chen L, Ren Z, Zhou X, Zeng J, Zou J, Li Y: Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and virulence by an oxazole derivative. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(2): 857-867, 2016.
- Guo L, McLean JS, Lux R, He X, Shi W: The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Sci Rep* 5: 18015, 2015.
- Guo L, McLean JS, Lux R, He X, Shi W: The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Scientific Reports* 5: 18015, 2015.
- Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S: Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig* 17(4): 1113-1125, 2013.

- Hasan S, Danishuddin M, Khan AU: Inhibitory effect of zingiber officinale towards Streptococcus mutans virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. *BMC Microbiol* 15: 1, 2015.
- Hilgert LA, Leal SC, Mulder J, Creugers NH, Frencken JE: Caries-preventive Effect of Supervised Toothbrushing and Sealants. *J Dent Res* 94(9): 1218-1224, 2015.
- Hwang JK, Shim JS, Pyun YR: Antibacterial activity of xanthorrhizol from Curcuma xanthorrhiza against oral pathogens. *Fitoterapia* 71(3): 321-323, 2000.
- Kim H-SKS-MKH-KKB-I: Antibacterial effect caused by the combination of xanthorrhizol and several surfactants. *Journal of Korean Academy of Oral Health* 35(1): 41-48, 2011.
- Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M: In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 47(3): 932-940, 2003.
- Kumar S, Tadakamadla J, Johnson NW: Effect of Toothbrushing Frequency on Incidence and Increment of Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent Res* 95(11): 1230-1236, 2016.
- Najah A. Mohammed NYH: Evaluation of antimicrobial activity of Curcumin against two oral bacteria *Automation, Control and Intelligent Systems* 3(2-1): 18-21, 2015.
- Nijampatnam B, Casals L, Zheng R, Wu H, Velu SE: Hydroxychalcone inhibitors of Streptococcus mutans glucosyl transferases and biofilms as potential anticaries agents. *Bioorg Med Chem Lett* 26(15): 3508-3513, 2016.
- Oon SF, Nallappan M, Tee TT, Shohaimi S, Kassim NK, Sa'ariwijaya MS, et al.: Xanthorrhizol: a review of its pharmacological activities and anticancer properties. *Cancer Cell Int* 15: 100, 2015.

- Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G, Jr., Tedesco AC, Ciancaglini P: Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 50(3): 353-359, 2005.
- Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO: Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 26(3): 341-348, 2011.
- Rolim JP, de-Melo MA, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NA, et al.: The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 106: 40-46, 2012.
- Rukayadi Y, Hwang JK: Effect of coating the wells of a polystyrene microtiter plate with xanthorrhizol on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *J Basic Microbiol* 46(5): 410-415, 2006.
- Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ: Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci* 45(1): 17-23, 2003.
- Steinberg D, Friedman M: Sustained-release drug delivery of antimicrobials in controlling of supragingival oral biofilms. *Expert Opin Drug Deliv*: 1-11, 2016.
- Takahashi N, Nyvad B: Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42(6): 409-418, 2008.
- Vahid-Dastjerdi E, Monadi E, Khalighi HR, Torshabi M: Down-Regulation of Glycosyl Transferase Genes in *Streptococcus Mutans* by *Punica Granatum L.* Flower and *Rhus Coriaria L.* Fruit Water Extracts. *Iran J Pharm Res* 15(2): 513-519, 2016.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C: Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 57(4): 680-684, 2006.

국내외 천연물의약품 연구개발 동향. In: 제2차 천연물신약연구개발촉진계획. 한국보건산업진흥원. 2006.

Abstract

**Photomechanical effects of *Curcuma xanthorrhiza* extract
on *Streptococcus mutans***

Hyun Jung Lee

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Baek Il Kim)

Streptococcus mutans synthesizes insoluble glucan in the process of growing oral biofilm, forming a structure that can be adhered to various oral bacteria, and causing the demineralization of teeth by releasing organic acid. Therefore, effective management of various bacteria in the mouth, including *S. mutans*, can prevent dental caries.

The various plants that exist in nature contain various physiological components and also contain antimicrobial ingredients to prevent bacterial infiltration. Curcuma, a plant of turmeric, has anti-inflammatory, antioxidant and antibacterial properties. It has already been reported that curcumin, xanthorrhizol which are in curcuma root has antibacterial activity against bacteria in oral cavity. In recent years, various attempts have been made in the fields of dentistry to utilize antibacterial, anti-inflammatory and anti-cancer therapies through photosensitizers and light irradiation. Although curcumin can be used as a photosensitizer to control the bacteria with light irradiation, there is no study on whether xanthorrhiza extract acts as a photosensitizer. The aim of this study were to investigated whether xanthorrhiza extract and curcumin, which are derived from natural materials, effectively inhibit *S. mutans* by photodynamic response to light irradiation and investigated the difference in antimicrobial activity according to irradiation time.

In this study, *S. mutans* ATCC 25175 strains was purchased from Korea Biotechnology Research Institute. As a photosensitizer, curcumin and xanthorrhiza extract powder were dissolved in dimethyl sulfoxide at a concentration of 1 mg/ml to prepare a stock solution. Dilutions of the stock solution were prepared at concentrations of 10, 100, 1000, and 10000 ng/ml. The light irradiation was performed using a Qraycam apparatus equipped with a 405 nm LED, and the optical density was 28.8 mW/cm². To compare the influence of irradiation time, 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240, 300 sec irradiation was applied. Survival was determined after irradiation of light for photodynamic reaction, by applied working solution into brain heart infusion solid medium and incubated at 37 °C and 10 %

CO₂ incubator for 24 hours. The difference in the number of viable cells among the groups according to the presence or absence of light irradiation was determined by the independent sample T-test and to compare the viable counts with the photosensitizer concentration, one-way ANOVA was conducted. All statistical analyses were performed using SPSS version 23.0.

The viable cell counts of xanthorrhiza extracts induced a photodynamic reaction under a light source of 405 nm and inhibited the growth of *S. mutans* at concentrations of 100 ng/ml or more. Curcumin inhibited growth at a lower concentration of 10 ng/ml, but was less effective at 10,000 ng/ml due to its lower solubility in water. When Xanthorrhiza extract was mixed with curcumin, all of the *S. mutans* were killed at the concentration of 1000 ng/ml, but the effect was decreased by the low solubility of curcumin at 10000 ng/ml. In addition, curcumin alone and xanthorrhiza-curcumin inhibited the growth of *S. mutans* completely by irradiation with light of 30 seconds, and in the case of xanthorrhiza extract, the growth was completely inhibited.

In conclusion, when xanthorrhiza extract is applied with a 405 nm light source, the minimum inhibitory concentration against *S. mutans* is lower than that of a substance without light irradiation. Therefore it can be used clinically even when with curcumin.

Key words: Natural extract, Oral bacteria, Oral disease, Photosensitizer, Photodynamic therapy, *Streptococcus mutans*