

B-2 관중의 항균작용 및 세포독성에 관한 연구

김승남* · 류인철* · 배기환# · 정종평* · 한수부* · 최상묵*

*서울대학교 치과대학 치주과학교실

#충남대학교 약학교실

목적

본 연구는 관중이라는 생약을 이용한 in vitro study 이다. 치주질환을 일으킨다고 알려진 세균들에 대한 관중의 항염작용과 치은섬유아세포와 조골세포에 대한 세포활성도 및 독성을 살펴보는 데 본 연구의 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 항균력검사

A. actinomycetemcomitans, *C. ochracea*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. viscosus*, *F. nucleatum* 등의 7종의 세균을 대상으로 관중과 chlorhexidine을 증류수로 각 0.2, 0.15, 0.1, 0.05%로 희석시켜 실험하였다.

Stab culture method를 변형하여 평판배지에 리터당 17g tryptone, 3g yeast extract, 2.5g glucose, 5g NaCl, 2.5g K₂SO₄, 0.5g sodium thioglycolate, 5ml hemin, 0.5mg menadion, 12g bacto agar를 혼합하여 배지를 만든 후 이 위에 위의 세균들을 도말하고 직경 9mm 정도의 팁을 세우고 위의 현탁액을 다시 부어 굳혀서 직경 9mm, 높이 5mm 정도의 홈을 만들어서 각 농도의 관중과 chlorhexidine을 20μl씩 부었다. 그 후 37°C에서 3-7일간 혐기성배양기 및 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후 vernier caliper를 사용하여 장축과 단축에서 1mm 단위까지로 세균성장억제부위의 직경을 측정하고 그 평균을 산출하였다.

2. 세포활성도조사

각 약제의 세포성장 및 생존에 미치는 영향을 관찰하고자 계대배양한 인체의 치은섬유아세포와 rat의 조골세포를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구계산기로 well당 1×10⁵개의 세포수가 되게 하여 접종 후 배양하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거한 후 HBSS로 세척하였다.

관중과 chlorhexidine을 증류수를 용매로 하여 녹인 다음 각 추출물과 배양액이 200μl가 되게 하였다. 이들을 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 24시간 배양하고 배양이 끝난 후 생리식염수에 용해한 MTT(methyl thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl tetrazolium bormide)용액 50μl를 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT용액을 제거하고 formazon결정을 용해시키기 위 DMSO를 50μl씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max, Molecular devices, U.S.A.)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 매실험마다 실험용액이 들어있지 않은 α-MEM 배양액 well을 사용하였다. 모든 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

3. 세포독성검사

세포가 합류하게 되면 세포를 trypsinization시켜 24-well당 1×10^4 개의 세포를 접종하였다. α -MEM으로 3일간 배양하여 세포가 약 70%합류되면 일정농도의 관중과 chlorhexidine, PDGF가 첨가된 α -MEM으로 24시간 더 세포배양을 실시하였고, 세포배양이 끝나기 2시간 전에 well당 5 Ci의 ^3H thymidine을 세포배양액에 첨가하였다. 그 후 배양액을 조심스럽게 제거하고, 각 well에 3ml의 냉 5% trichloroacetic acid(이하 TCA로 표기)를 첨가하여 4에서 10분간 세포를 고정하였다. 5% TCA를 제거하고 다시 냉 5% TCA로 4회 세척한 다음 1ml의 0.5N NaOH를 첨가하여 37°C에서 30분간 세포를 용해시켰다. 100ml의 세포용해물을 취하여 liquid scintillation counter(Beckamnn)로 radioactivity를 측정하여 DNA합성을 측정하였다.

결과

1. 항균효과

관중과 chlorhexidine을 각각 0.2, 0.15, 0.1, 0.05%로 희석하여 *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *S. mutans*, *A. viscosus* 등 7종의 치주병유발가능세균을 대상으로 항균실험을 하였다.

전체적으로 비교해보면 관중과 chlorhexidine 모두 저농도에서 고농도로 갈수록 항균력이 좋아지는 것을 알 수 있으며, 같은 농도에서 비교해보면 두균에서 비슷한 정도로 나타남을 알 수 있었다.

2. 세포활성도 효과

관중의 경우 치은섬유아세포와 조골세포에서 활성도 효과를 살펴보면, 0.2, 0.15%에서는 세포활성도가 많이 감소하나, 0.1, 0.05%에서는 거의 감소되지 않는 것을 알 수 있다. 하지만, chlorhexidine의 경우는 모든 농도에서 세포활성도가 감소되는 것으로 나타났다.

3. ^3H thymidine incorporation

관중의 경우 대조군과 양성대조군인 PDGF와 비교해서 0.2, 0.15%의 농도에서는 다소 감소되는 경향을 보이지만, 0.1, 0.05%에서는 비슷한 정도로 나타남을 알 수 있다. 반면, chlorhexidine의 경우는 모든 농도에서 감소되는 것을 알 수 있다.

결론

1. 관중과 chlorhexidine의 비교에서 항균력은 chlorhexidine이 다소 앞서지만 그 차이는 미미한 것으로 나타났다.
2. 세포활성도 및 ^3H thymidine incorporation 연구에서는 0.1, 0.05%의 관중이 세포독성이 적은 것으로 나타났다.