

상백피의 Sanggenon C 에 의한 *Streptococcus mutans* 의 생육 및 균부착 저해효과

박원재 · 이형재 · 양승각
태평양화학 기술연구소
(Received October 11, 1990)

The inhibitory Effect of Sanggenon C from the Root-bark of *Morus alba* L. on the Growth and the Cellular Adherence of *Streptococcus mutans*

Won Jae Park, Hyung Jae Lee and Seung Gak Yang
Pacific R & D center, Pacific Chemical Co., I.T.D. 686-5, Sindaebang-Dong, Dongjak-Ku, Seoul, Korea

Abstract— The methanolic extract of the root-bark of *Morus alba* L. (Mulberry tree) has the potent anti-bacterial activity against *Streptococcus mutans*. Its active component was identified to be sanggenon C. The active component had stronger anti-bacterial activity than berberine, having minimum inhibitory concentration (MIC) of 25 µg/ml. Moreover, the inhibitory effect of this component on the cellular adherence of *Streptococcus mutans* to glass surfaces also was more remarkable than that of berberine in the presence of glucosyltransferase (GTase) and sucrose *in vitro*. These results indicate that sanggenon C may play an important role in inhibiting plaque formation and caries incidence.

Keywords □ *Streptococcus mutans*, *Morus alba* L., sanggenon C, antibacterial, caries, glucan.

일반적으로 치아에서 발생하는 2대 질환은 충치 및 치주질환으로, 구강내 미생물 중 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)가 충치 초기단계에서 plaque 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁴⁾

이러한 충치를 예방하기 위한 목적으로 penicillin, erythromycin, tetracycline, spiramycin 같은 항생제나 chlorhexidine 같은 항균제가 사용되고 있는데,⁵⁻¹⁰⁾ 구강내에서 여러 부작용들이 있는 것으로 보고되어 있다.¹⁰⁾

본 연구에서는 구강내에 부작용이 적고 충치 예방 효과가 큰 성분을 찾기 위해 155종의 생약 methanol 추출물들을 검색한 결과, 상백피의 methanol 추출물이 다른 생약의 그것에 비해 *S. mutans*에 대한 항균활성과 균부착저해효과가 현저하게 컸으며 이 항균력의 주체가 sanggenon C임을 밝혔다.

실험방법

실험재료, 시약 및 기기— 실험에서 사용한 재료는 서울경동시장으로부터 구입한 상백피 등 155종 생약들이다. Chlorhexidine·digluconate, berberine 및 sodium lauryl sulfate (SLS)는 Sigma사에서, silica-gel 60G (230~400 mesh), silica-gel 60G 및 silica-gel 60GF₂₅₄는 Merck사에서, brain heart infusion (BHI)은 Difco Lab. (Detroit, Mich.)에서 구입하였다. Methanol은 Merck사에서, benzene, n-hexane, ethylether, ethylacetate, dimethylsulfoxide (DMSO)는 Mallinckrodt사에서 구입하였다.

사용한 기기는 ¹H-NMR spectrometer (300 MHz, 일본 동경대학에 의뢰), Cecil사의 UV/VIS spectrophotometer (CE 5500), Nicolet사의

FT-IR spectrophotometer (20-SXC/GC), Hewlett Packard HP5985B의 GC/MS spectrometer, Spectra-Physics사의 HPLC (SP8800) 등이다.

Sanggenon C의 분리 및 정제—건조된 상백피 2kg을 methanol 10.5l로 7일간 침적 추출한 후, 진공건조하여 methanol 추출물을 얻었다. 이 추출물을 증류수에 현탁시키고 hexane, benzene, ethylether, ethylacetate로 계통추출하여 활성있는 ether 분획 28g을 얻었다. 이 분획을 benzene/methanol (4/1, v/v)의 용출용매로 silica-gel column chromatography하여 3개의 분획을 얻었다. 그중 첫 분획을 chloroform/methanol/water (50/10/1, v/v/v)의 전개용매로 preparative TLC하여 $R_f=0.47$ 인 성분을 분리하였다. 이 성분을 UV (207 nm) detector (Model Spectroflow 757)와 integrator (Model SP 4270) 및 RP-18 column을 이용하여 methanol/water (7/3, v/v)의 용매를 0.8 ml/min flow rate로 용출시켜 HPLC에 의해 분리정제한 후, $^1\text{H-NMR}$, GC/MS, UV, 그리고 IR 등으로 분석하여 sanggenon C를 확인하였다.^{11,12)}

실험균주—실험에서 사용한 균들은 ATCC로부터 분양받은 *S. mutans* ATCC 27607 및 27351 (serotype g)과 본 실험실에서 충치보유자들로부터 직접 분리한 야생균주 및 서울대학교 치과대학 최선진 교수로부터 분양받은 ATCC 25175 (serotype c) 등으로, 각 실험균들은 Mitis salivarius (M.S.) agar에 계대배양후 4°C에서 보관하며 사용하였고 Stock 균주는 BHI broth에서 배양한 배양액에 glycerol과 DMSO를 첨가하여 -70°C에서 보관하였다. M.S. agar 상의 균은 BHI broth에서 15~16시간 배양한 후, 각 실험에 사용하였다.

항균력실험—각 시료들의 *S. mutans*에 대한 항균력은 agar dilution법에 의해 측정하였다. 즉, BHI agar에 각 시료를 적당농도로 희석하여 가한 후 petri-dish에 부어 균희 후 BHI broth에서 15~16시간 배양한 *S. mutans* 균을 1백금이 취하여 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후, 균의 생육여부를 관찰하여 생육이 관찰되지 않는 가장 낮은 농도를 최소저지농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)로 하였다.

균부착 저지실험—2% sucrose를 함유한 BHI

broth에 각 시료를 희석한 후 잘 세척된 glass tube에 넣고 BHI broth 상에서 15~16시간 배양시킨 각 *S. mutans* 균을 2방울씩 접종한 다음, 30°로 기울인 상태로 37°C에서 48시간 배양하여 glass 내벽에서의 균부착 여부를 관찰하였다. 기벽에 균의 부착이 일어나지 않는 가장 낮은 농도를 최소부착 저지농도 (minimum antiadhesive concentration; MAC)로 하였다.^{13,14)}

결과 및 고찰

생약추출물들의 항균력—충치의 원인으로 알려진 *S. mutans*에 대한 항균활성을 갖는 성분을 얻기 위하여 각종의 생약을 대상으로 항균력을 검색한 결과, 상백피, 오배자, 은행잎, 백자인 등의 methanol 추출물들이 강한 항균력을 나타낸 반면에 단삼, 산수유, 황련, 가자, 소산초 등의 methanol 추출물들은 약한 항균력을 나타내었다 (Table I). 이들 중 상백피의 methanol 추출물이 실험에 사용된 모든 *S. mutans*에 대해 비선택적으로 강한 항균력을 나타내었다.

상백피로부터 활성성분을 확인하기 위해 여러 용매를 사용, 분획하여 항균력을 검색한 결과, ether 분획이 다른 분획에 비해 뛰어난 항균력이 있음을 밝혀냈다. 또한, ether 분획으로부터 뛰어난 항균활성 성분으로 확인된 sanggenon C를 분리정제하였고, 항균 및 균부착저지효과에 대해 SLS, chlorhexidine digluconate 및 berberine hydrochloride와 비교 실험하였다.

항균효과—상백피의 methanol 추출물 및 각종 분획성분들의 *S. mutans* 균에 대한 항균력을 나타내면 Table II과 같다. Table II에서 보는 바와 같이 상백피의 methanol extract의 각종 분획 성분들 중에서 ether 분획이 가장 강한 항균력을 나타내었으며, sanggenon C도 유사한 항균력을 나타내었다. 이는 ether 분획 중에 sanggenon C 이외의 항균력있는 물질들의 존재를 의미하는 것으로, 이러한 물질들은 최근 항균성분으로 보고된 상백피 중의 benzofuran계의 moracin 화합물들¹⁵⁻¹⁷⁾과 kuwanon 화합물들¹⁸⁻²⁰⁾로 사료된다.

한편, sanggenon C의 항균력은 비교성분으로 사용한 생약유래 berberine이나 치약의 발포제로

Table I—Anti-bacterial activities of the methanol extracts of plants against *S. mutans*

| Methanol extracts of plants | | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------|-----------|------------------|-----------|------|
| Crude drugs | Botanical source | ATCC27351 (g) | ATCC27607 | ATCC25175 (c) | Wild type | |
| | | | | | 1 | 2 |
| Mori cortex Radicis (桑白皮) | <i>Morus alba</i> L. | 200 | 200 | 200 | 100 | 50 |
| Galla Rhois (五倍子) | <i>Melaphis chinensis</i> (Bell) | 100 | 200 | 100 | 300 | 250 |
| Ginkgo Folium (銀杏葉) | <i>Ginkgo biloba</i> L. | 200 | 200 | 100 | 250 | 500 |
| Thujae Semen (柏子仁) | <i>Biota orientalis</i> (L.) Endl. | 200 | 500 | 100 | 100 | 200 |
| Salviae Miltiorrhiza Radix (丹參) | <i>Salvia miltiorrhiza</i> BUXGE | 200 | 500 | 200 | 500 | 500 |
| Corni Fructus (山茱萸) | <i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini | 200 | 500 | 200 | 500 | >500 |
| Coptidis Rhizoma (黃連) | <i>Coptis japonica</i> MAKINO | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Chebulae Fructus (訶子) | <i>Terminalia chabрила</i> Retz | 300 | 500 | 500 | >500 | >500 |
| Zanthoxyli Semen (小山椒) | <i>Zanthoxylum piperitum</i> De Candolle | >500 | 500 | 500 | 500 | >500 |
| Magnoliae officinalis Cortex (唐厚朴) | <i>Magnolia officinalis</i> ReHD. et WILS | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Asiasari Radix (細辛) | <i>Asiasarum sieboldi</i> F. Maekawa | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Houttuyniae Herba (十藥) | <i>Houttuynia cordata</i> Thunb. | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Alpiniae Rhizoma (高良姜) | <i>Alpinia officinarum</i> HANCE | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Citri leiocarpae Exocarpium (陳皮) | <i>Citrus unshiu</i> MARK. | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Lophatheri Herba (淡竹葉) | <i>Lophatherum gracile</i> BRONGEN | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| Paeoniae albae Ra- dix (白芍藥) | <i>Paeonia lactiflora</i> PALL. | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |

사용되는 SLS 보다는 강한 항균력을 나타내었으나 chlorhexidine 보다는 약한 항균력을 나타내었다. 그러나 chlorhexidine 의 항균력은 균의 종류에 따라 차이가 있었으며 특히, 야생균주들은 높은 내성을 나타내는 반면에, sanggenon C 의 최소저지농도는 모든 균에 대해 25 $\mu\text{g/ml}$ 으로서 비선택적인 항균력을 나타내었다.

이와 같이 sanggenon C 의 항균력은 *S. mutans*

에 가장 효과적인 살균제로 알려진 chlorhexidine 보다는 낮은 활성을 보였지만 chlorhexidine 이 가지는 각종 부작용 및 내성균주의 발현을 감안한다면 충치예방에 관한 성분으로 계속 연구해 볼 가치가 있다고 생각된다.

균부착 저지효과—상백피의 methanol 추출물과 각종 분획성분들의 glass 표면에서의 균부착 저지효과에 관한 결과를 Table III에 나타내었다. Table

Table II—Anti-bacterial activities of the methanol extract fractions of *Morus alba* L. against *S. mutans*

| Anti-bacterial agents | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | Wild type | |
|--|--------------------------|-----------|---------------|-----------|-------|
| | ATCC27351 (g) | ATCC27607 | ATCC25175 (c) | 1 | 2 |
| | | | | | |
| Root-bark of <i>Morus alba</i> L. | | | | | |
| Methanol extract | 200 | 200 | 200 | 100 | 50 |
| Methanol extract ether fraction | 25 | 50 | 25 | 25 | 25 |
| Methanol extract EtoAc fraction | 500 | 500 | 500 | 300 | 200 |
| Methanol extract H ₂ O fraction | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Sanggenon C | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| SLS | 10 | 100 | 50 | 50 | 50 |
| Chlorhexidine-digluconate | 1.0 | 2.5 | 1.0 | 5.0 | 10.0 |
| Berberine hydrochloride | 200 | 200 | 100 | 200 | 200 |

Table III—Anti-adhesive activities of the methanol extract fractions of *Morus alba* L. against *S. nyctans*

| Anti-bacterial agents | MAC ($\mu\text{g/ml}$) | | | Wild type | |
|--|--------------------------|-----------|---------------|-----------|-------|
| | ATCC27351 (g) | ATCC27607 | ATCC25175 (c) | 1 | 2 |
| | | | | | |
| Root-bark of <i>Morus alba</i> L. | | | | | |
| Methanol extract | 100 | 120 | 50 | 50 | 50 |
| Methanol extract ether fraction | 10 | 20 | 10 | 10 | 10 |
| Methanol extract EtoAc fraction | 250 | 300 | 200 | 100 | 100 |
| Methanol extract H ₂ O fraction | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| Sanggenon C | 10 | 20 | 20 | 10 | 10 |
| SLS | 10 | 20 | 25 | 25 | 10 |
| Chlorhexidine-digluconate | 0.6 | 1.0 | 0.6 | 2.5 | 10 |
| Berberine hydrochloride | 100 | 100 | 100 | 1000 | 500 |

III에서 보는 바와 같이 상백피의 methanol 추출물의 분획성분들 중에서 ether 분획의 균부착 저지효과가 가장 뛰어났으며 sanggenon C도 비슷한 활성을 나타내었다.

동시에 비교성분들의 균부착 저지효과도 앞에서 서술한 항균활성과 유사한 경향을 나타내었다. 항균력이 있는 Bis-Biguanide의 일종인 chlorhexidine과 음이온성 계면활성제의 일종인 SLS는 *S. mutans*에 대한 항균효과가 뛰어날 뿐만 아니라, 효소활성에 대해 비특이적인 저해작용을 가진 성분으로서 GTase를 직접적으로 저해하여 glucan 형성을 억제한다고 보고되어 있다.²¹⁾ 따라서 상기 비

교실험 화합물들이 높은 농도에서 균의 생육을 완전히 억제시키지만, sub-lethal 농도에서는 균의 대사활성을 억제하여 glucan 합성에 관여하는 *S. mutans*의 균체의효소인 GTase 생성을 저해하거나 GTase 활성을 저해함으로써 균부착을 저지한다고 사료된다.

반면에 상백피의 methanol 추출물이나 sanggenon C는 GTase 활성을 직접적으로 저해하지는 않지만 *S. mutans*의 대사를 저해함으로써 GTase 생성을 감소시켜 glucan 형성을 억제하므로 균부착을 저지하는 것으로 사료된다.

결 론

충치예방제를 개발하기 위한 시도로 155종의 생약들의 *S. mutans*에 대한 항균력을 검색한 결과, 상백피의 methanol 추출물이 가장 강한 항균활성을 갖고 있는 것을 확인하였으며 상백피의 sanggenon C가 그 주체임을 밝혔다. 또한, 상백피의 methanol 추출물 및 sanggenon C가 sub-lethal 농도에서도 *S. mutans* 균의 부착저지효과가 있다는 것이 확인되었다. 이와 같이 상백피의 *S. mutans*에 대한 항균 및 균부착저지효과는 plaque 형성의 1차적인 단계를 봉쇄하는 것으로 이를 이용한 충치 방지제의 개발가능성이 있다고 사료된다.

문 헌

- 1) Orland, F.J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **78**, 285 (1959).
- 2) Fitzgerald, R.J. and Keyes, P.H., *J. Am. Dent. Ass.*, **61**, 9 (1960).
- 3) Keyes, P.H., *Arch. Oral Biol.*, **1**, 304 (1960).
- 4) Guggenheim, B., König, K.G. and Muhlemann, H. R., *Helv. Odontol. Acta*, **9**, 12 (1965).
- 5) McClure, F.F. and Hewitt, W.L., *J. Dent. Res.*, **25**, 441 (1946).
- 6) Stephan, R.M., Fitzgerald, R.J., McClure, F.J., Harris, M.R. and Jordan, H., *J. Dent. Res.*, **32**, 421 (1966).
- 7) Keyes, P.H., Rowberry, S.A., Englander H.R. and Fitzgerald, R.J., *J. Oral Ther. Pharmacol.*, **3**, 157 (1966).
- 8) Handelman, S.L., Mills, J.R. and Hawes, R.R., *J. Oral Therap. Pharmacol.*, **2**, 338 (1966).
- 9) Fitzgerald, R.J., *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, **1**, 296 (1972).
- 10) Fitzgerald, R.J., *J. Am. Dent. Ass.*, **87**, 1006 (1973).
- 11) Nomura, T., Fukai, T., Hano, Y. and Uzawa, J., *Heterocycles*, **16**, 2141 (1981).
- 12) Kimura, Y., Okuda, H., Nomura, T., Fukai, T. and Arichi, S.: Effects of phenolic constituents from the Mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelets. *J. of Natural Products*, **49**(4), 639 (1986).
- 13) Hamada, S. and Slade, H.D.: Adherence of serotype e *Streptococcus mutans* and the inhibitory effect of Lancefield group E and *S. Mutans* type e antiserum. *J. Dent. Res.*, **55**, 65 (1976).
- 14) Mukase, H. and Slade, H.D.: Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. II. Nature of the binding site and the adsorption of dextran-levan synthetase enzymes on the cell-wall surface of the streptococcus. *Infect. Immun.*, **9**, 419 (1974).
- 15) Takasugi, M., Nagao, S. and Masamune, T., *Tetrahedron Lett.*, **9**, 797 (1978).
- 16) Takasugi, M., Nagao, S., Ueno, S., Masamune, T., Shirata, A. and Takahashi, K.: Moracin C and D, new phytoalexins from diseased mulberry. *Chem. Lett.*, 1239 (1978).
- 17) Nomura, T., Fukai, T., Uno, J. and Arai, T., *Heterocycles*, **9**(11), 1593 (1978).
- 18) Takasugi, M., Ishikawa, S., Nagao, S., Masamune, T., Shirata, A. and Takahashi, K.: Albanins F and G, natural Diels-Alder adducts from mulberry. *Chem. Lett.*, 1577 (1980).
- 19) Zenyaku, K.K.: Antibacterial Kuwanon J compound prepared by extracting plant of genus *Morus* with organic solvent. JP 59-150538 (1983).
- 20) Zenyaku, K.K.: Kuwanon compounds used as antimicrobials effective against Gram-positive bacteria. JP 58-43990 (1983).
- 21) Ciardi, J.E., Brown, W.H. and Rolla, G.: The effect of antibacterial compounds on glucosyltransferase activity from *streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, **23**, 301 (1978).