

화피의 충치균과 치주질환균에 대한 항균활성 및 항염효과

임종필*

우석대학교 약학대학

Antibacterial Activity against *S. mutans* or *P. gingivalis* and Anti-inflammatory Effect of Betulae Cortex

Jong Pil Lim*

College of Pharmacy, Woosuk University

Betulae Cortex of *Betula platyphylla* Suk. var. *japonica* Hara (Betulaceae) has long been used for treatment of various inflammation, fever and cough in Eastern Asia. In order to investigate antibacterial activity of the Betulae Cortex against *Streptococcus mutans* or *Porphyromonas gingivalis*, MIC (minimal inhibitory concentration) and pH were checked, and for anti-inflammation activity, the experiments about trypsin-induced paw edema, vascular permeability and myeloperoxidase activity in rat's hind-paw tissue, were carried out with various extracts of Betulae Cortex (BCXs) respectively. The BCXs showed significant antibacterial activity, and at the dose of over 50 mg/kg, BCX showed significant inhibition on the paw edema, vascular permeability and myeloperoxidase activity. These results indicate that BCXs have antibacterial activity against oral cariogenic bacteria and anti-inflammatory effect.

Key words : Betulae Cortex(樺皮), *streptococcus mutans*, *porphyromonas gingivalis*, antibacterial, anti-inflammatory

서 론

樺皮 (Betulae Cortex)는 자작나무과 (Betulaceae)에 속하는 자작나무 (*Betula platyphylla* Suk. var. *japonica* Hara) 또는 기타 동속식물의 수피이며, 화목피라고도 하는데 우리나라 각지에서 야생하고 있다^{1,2}. 성분으로는 polyphenol성 화합물로서 catechin 및 epicatechin 등을 함유하며, lupane계열의 triterpene계열의 화합물로서 betulin이 함유되어 있다. 이외에도 diarylheptanoid 화합물로서 betulaplatoside Ia, Ib, aceroside VIII 등과 arylbutanoid 화합물로서 betulaplatoside II, rhododendrin 등이 분리 보고되어 있다³⁻⁵. 맛은 쓰고, 성질은 차며 胃經에 들어가 清熱利濕, 祛痰止咳, 消腫解毒하는 효능이 있으며 약리작용으로는 지해, 거담, 천식억제, 항균작용이 있어 폐의 풍독, 이질, 유옹에 쓰이며 화상에는 태운 가루를 바르기도 한다⁶⁻⁸.

충치의 원인은 구강 내에서 원인 세균이 생성하는 glucosyltransferase에 의하여 당질로부터 점착성의 불용성 glucan이 형성되어 치아의 표면에 부착하면 이 glucan에 원인세

균이 증식함에 따라 국소적으로 각종 유기산이 생성되어 치아 표면의 enamel질을 분해하는 것이 초기 발생기전으로 알려져 있다^{9,10}. 충치 원인세균으로는 *Streptococcus spp* 및 *Lactobacillus spp*에 속하는 일부의 종들이 보고되어 있으며, 그 중 구강다형연쇄상구균인 *Streptococcus mutans* 등이 가장 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{11,12}. 치주질환은 흔히 풍치라고도 하는데, 병의 정도에 따라 가벼운 치은염 (*gingivitis*)과 염증이 진행된 치주염 (*periodontitis*)으로 나뉘며, 질환을 일으키는 주요한 원인은 구강 내에 존재하는 수종의 세균 군에 의하는데 특히 *Porphyromonas gingivalis*가 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다. *P. gingivalis*는 그람 음성 혐기성 세균으로 치주질환을 앓고 있는 환자의 병소에서 그 수가 증가되며 질환이 진행됨에 따라 열구상피에 침투하여 숙주조직과 세포에서 독소를 만들어 치주조직에 해를 미치게 된다¹³⁻¹⁶.

또한 염증에 관한 근래의 연구결과를 보면, 수종의 단백질분해효소들은 염증세포에 발현하는 proteinase-activated receptor (PAR)의 N-말단의 특이적 인식부위를 절단하여 활성형으로 변화시키는데, trypsin 등은 PAR-2를 활성화시켜서 광범위한 염증을 일으킨다^{17,18}. 그리고 염증 과정에서 중요한 역할을 하는 PAR-2는 혈관투과성의 증가, neutrophil의 침윤 및

* 교신저자 : 임종필, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : limjp@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1571

· 접수 : 2011/05/25 · 수정 : 2011/07/04 · 채택 : 2011/07/15

proinflammatory cytokinase의 분비를 촉진한다^{19,20}. 그 중 PAR-2에 의해 유도되는 염증반응이 trypsin억제제 등에 의해 억제되고, neutrophil 축적은 다양한 염증질환의 특징이 되며 neutrophil은 myeloperoxidase (MPO)라는 효소를 과립에 가지고 있으므로, 염증부위에 침윤된 neutrophil를 정량하기 위해서는 MPO활성을 측정하는 방법이 이용되고 있다²¹.

그 동안 화피에 대한 연구로, Huh등²²은 화피의 부탄올 분획이 collagenase 투여에 의한 토끼의 골관절염 모델에서 proteoglycan이나 collagen 등의 분해억제를 통하여 치료활성을 나타내는데, 이러한 작용은 COX-2, MMP-3 (matrix metalloproteinase-3) 및 MMP-13의 발현억제 등에 의한 활성이라고 하였으며, Manez등²³은 betulin이 염증에 대한 동물모델(귀부종)에서 항염증 작용을 가지고 있다고 하였고, Ju등²⁴은 화피의 추출물이 강한 항산화 작용을 가지고 있으며 특히 diarylheptanoid 화합물 또는 arylbutanoid 화합물은 항산화 활성과 superoxide 소거작용, CCl₄로 야기된 장해에서 간보호 작용을 가지고 있다고 보고한 바 있으며, Cho등²⁵은 화피 추출물이 아토피 동물모델인 NC/Nga 마우스에서 picryl chloride의 반복적인 투여로 야기되는 아토피성 피부염을 억제하는데, 기전연구에 의하면 화피 추출물은 IFN- γ 의 발현에는 영향을 미치지 않으면서 IL-4 발현을 억제한다고 하였고, Gong등²⁶은 betulin이 강력한 HSV type 1 및 type 2에 대하여 항바이러스 작용을 가지고 있으며, 특히 acyclovir와 상승작용이 있다고 보고하였으며, Pyo등²⁷은 betulin이 폐암세포주에 대하여 단백질 발현 변화 및 세포사멸 (apoptosis)을 통해 항암활성을 갖는다고 보고한 바 있다.

그러나 화피의 충치균 및 치주질환에 관련한 항균활성이나 항염효과에 관한 연구는 보고된 바 없어서 실험을 통하여 의견을 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 균주

본 실험에 사용한 화피는 전주시 보화당약업사에서 구입한 것 중 정품만을 선별하여 세절한 후 각기 5배량의 증류수, 80% 메탄올 및 80% 에탄올을 넣어 3시간 환류냉각장치 하에서 가열 추출하고 여과한 뒤 감압 농축한 다음 동결 건조하여 각기 물엑스 (WX), 메탄올엑스 (MX) 및 에탄올엑스 (EX)를 만들어 이것들을 희석하여 시료 (BCX)로 사용하였다. *Streptococcus mutans* ATCC25175 및 *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 표준균주는 한국미생물보존센터 (서울시 서대문구)에서 구입하여 사용하였으며, 세균배양 및 보존에는 Table 1과 같이 각각 BHI (Difco Co, USA) 및 조제 배지를 사용하였다.

실험용 동물로는 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 대한바이오링크 (충북 음성군)에서 구입하여 180±20 g인 것을 실험실 환경에서 충분한 사료와 물을 공급하면서 적응시킨 후에 실험에 사용하였으며, 본 연구는 우석대학교 동물 윤리위원회 규정에 따라 실시하였다. 기타 시약은 특급이상 제품 (Sigma Co., MO, USA)으로 사용하였다.

Table 1. Strains and cultivation conditions for oral cariogenic bacteria

Strains	Cultivation conditions
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	BHI (Brain Heart Infusion) media 37°C, facultatively anaerobic
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC33277	3% tryptic soy broth, 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H ₂ O, 0.5 mg/ml hemin, 2 μ g/ml vitamin K1 37°C, facultatively anaerobic

2. 최소발육저지농도 측정

조제된 각 추출물의 최소발육저지농도 (minimal inhibitory concentration; MIC) 측정은 Lorian²⁸와 Murray²⁹의 방법에 준하여 측정하였다. 37°C에서 24시간 배양한 *S. mutans* 및 *P. gingivalis* 균액을 각각 Table 1에서와 같이 BHI broth 및 조제배양액에 약 103 CFU/ml 되도록 접종한 후 멸균된 시험관에 무균적으로 분주하고 각 추출액을 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2 및 1.6 μ g/ml 되도록 첨가한 후 37°C에서 혐기성배양기 (Model Bactron I, Sheldon Mfg. Co., Comelius, OR, USA)에서 3일간 배양하여 spectrophotometer (Genesys 5, Milton Roy Co., PA, USA)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 추출물 농도에 따른 pH 변화 측정

상기와 같이 37°C에서 24시간 배양한 *S. mutans* 및 *P. gingivalis* 균 액을 각각 BHI broth 및 조제배양액에 약 103 CFU/ml 되도록 접종한 후 멸균된 시험관에 무균적으로 분주하고 각 추출액을 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 및 3.2 μ g/ml 되도록 첨가한 후 37°C에서 혐기적으로 3일간 배양하여 pH meter (701A, Orion Co., MA, USA)로 pH를 측정하였다.

4. Trypsin에 의한 부종 측정

쥐가 물을 자유롭게 마시도록 하며 18시간 절식시키고, 생리식염수 (saline) 및 각 추출물을 농도별 (5, 10, 50, 100 mg/kg)로 경구 투여한 1시간 후 ketamine HCl (30 mg/kg)과 xylazine (6 mg/kg)을 근육 주사하여 마취시킨 뒤, trypsin (500 pmol)을 생리식염수에 녹여 100 μ l씩 쥐의 뒷다리 발바닥에 주사하였다. 부종의 크기는 쥐의 발바닥 주사직전과 1시간 후에 plethysmometer (Ugo Basile Co., Comerio, VA, Italy)을 이용하여 측정하였으며 전후 차이로 계산하였다. 부종 억제율은 다음과 같은 식으로 계산하였다. 이때 A는 추출물을 투여하지 않은 군 (saline)의 수치이며, B는 각 추출물을 투여한 군의 수치이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

5. Trypsin에 의한 혈관투과성 측정

Trypsin주사에 의한 혈관투과성은 Katayama등³⁰의 방법에 따라 측정하였다. 생리식염수 및 각 추출물을 농도별로 경구투여하고 1시간 뒤, 2.5 mg/kg의 Evans blue를 생리식염수에 녹여 정맥 주사한 직후에 trypsin을 100 μ l씩 쥐 발바닥에 주사하고, 1시간 후 쥐를 죽인 뒤 발바닥을 제거하여 무게를 측정하고 잘게 썰어 마개 있는 시험관에 넣어 1N KOH용액 1 ml를 붓고 37°C

에서 하루 밤을 침출시킨 후 0.6 N H₃PO₄와 acetone (5 : 13) 혼합액을 9 ml 가하고 수조 동안 시험관을 세계 흔들어 3,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 spectrophotometer로 620 nm에서 흡광도를 측정 한 후, Evans blue 표준곡선에 의하여 농도를 구하고 $\mu\text{g/g}$ 으로 표시하였다. 혈관투과성 억제율은 다음과 같은 식으로 계산하였다. 이때 A는 추출물을 투여하지 않은 군 (saline)의 수치이며, B는 각 추출물을 투여한 군의 수치이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

6. Myeloperoxidase 정량

생리식염수 및 각 추출물을 농도별로 경구 투여한 1시간 후 trypsin을 쥐 발바닥에 주사하여, 6시간 후 쥐 발바닥을 절취하여 무게를 측정하고 myeloperoxidase (MPO) 활성도를 Bradley등³¹⁾의 방법에 따라 수행하였다. 발바닥 조직을 잘게 썰어서 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB)를 포함하는 KH₂PO₄ / K₂HPO₄ buffer (pH 6.0)중에 0℃에서 45초 동안 전동 homogenizer로 균질화한 후 4℃에서 3,000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다. MPO 활성도를 측정하기 위하여 96-well microtiter plate에 상층액 50 μl 와, 50 μl 의 phosphate buffer 함유 0.5% HTAB (pH 6.0), 50 μl 의 o-dianisidine (0.68 mg/ml in distilled water)을 첨가하고 반응을 촉진하기 위하여 새로 조제한 0.003% hydrogen peroxide를 가하였다. 그리고 450 nm에서 흡광도차를 이용하여 계산하였다. MPO 활성도 억제율은 다음 식으로 계산하였다. 이때 A는 추출물을 투여하지 않은 군 (saline)의 수치이며, B는 각 추출물을 투여한 군의 수치이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

7. 통계처리

실험성적은 평균치 \pm 표준오차 (mean \pm SE)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균차이는 student's t-test로 분석하여 p<0.05일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 용매에 따른 추출물 수득량

실험용 화피를 세절한 후 환류냉각장치에 각기 5배량의 증류수, 80% 메탄올 및 80% 에탄올을 넣어 각각 3시간씩 가열 추출하고 여과한 뒤 감압 농축한 다음 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 용매별 수득량은 Table 2와 같다. 수득량은 용매별로 80% methanol > 80% ethanol > water 순으로 methanol 추출량이 제일 높았다.

Table 2. Extracted yields of Betulae Cortex by various solvents

Solvents	Extracted yield (%) [†]
distilled water	9.7
80% methanol	11.2
80% ethanol	10.4

[†] Betulae Cortex were extracted for 3 hours by heating, and the filtrate was lyophilized.

2. 최소발육저지농도 (MIC) 측정

Lorian²⁸⁾와 Murray²⁹⁾의 방법에 준하여 *S. mutans* 및 *P. gingivalis* 균에 대하여 측정 한 각 추출물의 MIC 측정결과는 Table 3과 같다. 80% ethanol ex.의 *S. mutans*에 대한 MIC ($\mu\text{g/ml}$)는 100이고, *P. gingivalis*에 대한 MIC는 50으로 다른 용매의 추출물보다 우수하였다.

Table 3. MIC by various BCXs against *S. mutans* and *P. gingivalis*

Strains	BCX	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)							MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		200	100	50	25	12.5	6.3	3.2		1.6
<i>S. mutans</i>	WX	+	++	++	++	++	++	++	++	>200
	MX	-	+	++	++	++	++	++	++	200
	EX	-	-	+	++	++	++	++	++	100
<i>P. gingivalis</i>	WX	-	+	+	++	++	++	++	++	200
	MX	-	-	+	++	++	++	++	++	100
	EX	-	-	-	+	++	++	++	++	50

MIC: minimal inhibitory concentration. BCX: Extract of Betulae Cortex. WX: water ex., MX: 80% methanol ex., EX: 80% ethanol ex. Bacteria were incubated for 3 days at 37°C in the cultivation conditions as Table 1, with various BCXs. The experiments were performed at least three times. Symbols: ++, growth; +, weak growth; -, no growth

3. 추출물 농도에 따른 pH 변화 측정 결과

화피의 각 추출물을 농도별로 *S. mutans* 및 *P. gingivalis* 균에 첨가하여 배양이 끝난 액체배지의 pH를 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 각 추출물로 *S. mutans*와 함께 배양했을 때는 농도에 따라 pH가 6.10으로부터 점차 증가하여 각 추출물의 농도 ($\mu\text{g/ml}$)가 50.0과 100.0에서 유의성을 나타냈다. 그러나 *P. gingivalis*의 경우에는 pH가 7.0 근처에 머물러 유의성은 보이지 않았으므로, Table 4에는 에탄올 추출물의 결과만을 표시하였다.

Table 4. pH values by various concentrations of BCXs cultured with *S. mutans* or *P. gingivalis*

Concentration of BCX ($\mu\text{g/ml}$)	pH value [†]			
	WX	S. mutans		P. gingivalis
		MX	EX	EX
0.0 (control)	6.10 \pm 0.02	-	-	6.98 \pm 0.12
3.2	6.16 \pm 0.43	6.14 \pm 0.37	6.17 \pm 0.82	6.86 \pm 0.54
6.3	6.16 \pm 0.22	6.17 \pm 0.12	6.21 \pm 0.09	7.01 \pm 0.27
12.5	6.19 \pm 0.26	6.21 \pm 0.08	6.29 \pm 0.91	6.91 \pm 0.84
25.0	6.23 \pm 0.08	6.26 \pm 0.31	6.34 \pm 0.11	7.01 \pm 0.03
50.0	6.39 \pm 0.71 [*]	6.55 \pm 0.21 [*]	6.89 \pm 0.12 [*]	6.88 \pm 0.49
100.0	6.59 \pm 0.35 [*]	6.72 \pm 0.11 [*]	6.91 \pm 0.24 [*]	6.95 \pm 0.74

BCX: Extract of Betulae Cortex. WX: water ex., MX: 80% methanol ex., EX: 80% ethanol ex. [†] Bacteria were incubated for 3 days at 37°C in the cultivation conditions as Table 1, with various BCXs or saline (control). Values are mean \pm S.E. *Significantly different from the control at the p<0.05 level.

4. 부중억제를 측정 결과

PAR-2 효능약물인 trypsin으로 유발된 쥐의 뒷발바닥 부종은 생리식염수 단독 처리 시보다 유의성 있게 증가하였다. Trypsin으로 유발된 부종을 보면 각 추출물 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 유의성 있는 억제율을 보였으나 50 mg/kg 이상에서는 큰 차이가 나지 않았으며, 10 mg/kg이하에서는 유의성이 보이지 않았다. 이때 증류수 추출물과는 달리, 80% 메탄올 및 80% 에탄올 추출물의 경우는 큰 차이는 없었다(Fig. 1).

5. 혈관투과성 억제율 측정 결과

Trypsin을 500 pmol씩 쥐 발바닥에 주사한 1시간 후 Evans blue의 투과성이 뚜렷하게 높아졌다. 그러나 쥐 발바닥 조직의 Evans blue 혈관 투과성을 보면 부종억제술에서와 같이 각 추출물 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 유의성 있는 억제율을 보였으나, 50 mg/kg 이상에서의 억제율은 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 2).

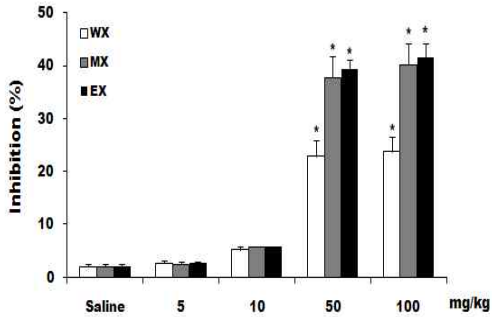


Fig. 1. Inhibition effects of BCXs on trypsin-induced paw edema in rats. BCX: Extract of Betulae Cortex. WX: water ex. of Betulae Cortex, MX: 80% methanol ex. of Betulae Cortex, EX: 80% ethanol ex. of Betulae Cortex. Rats (SD, male, 180±20 g) were administered saline or BCXs (mg/kg) orally 1 h prior to subplantar injection of trypsin (500 pmol). The size of edema was assessed by measuring the volume of the hind-paw immediately before and 1 h after the agonist injection. Data show the mean±SE from 8-10 rats. *p<0.05 compared to the saline group.

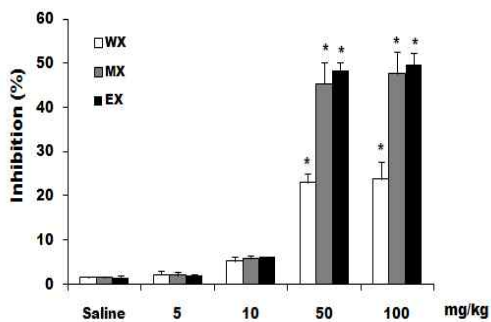


Fig. 2. Inhibition effects of BCXs on trypsin-induced vascular permeability in the paw of rats. BCX: Extract of Betulae Cortex. WX: water ex. of Betulae Cortex, MX: 80% methanol ex. of Betulae Cortex, EX: 80% ethanol ex. of Betulae Cortex. Rats (SD, male, 180±20 g) were administered saline or BCXs orally 1 h prior to subplantar injection of trypsin (500 pmol), and rats received an intravenous injection of 25 mg/kg Evans blue in saline immediately before the agonist injection. Data show the mean±SE from 8-10 rats. *p<0.05 compared to the saline group.

6. Myeloperoxidase 활성도 측정 결과

생리식염수 및 각 추출물을 농도별로 경구 투여한 1시간 후 trypsin을 쥐 발바닥에 주사하여, 6시간 후 쥐 발바닥 무게를 측정하고 myeloperoxidase (MPO) 활성도를 측정된 결과 각 추출물 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 유의성 있는 MPO활성 억제효과를 나타냈는데, 50 mg/kg 이상의 경우 MPO활성억제율도 부종이나 혈관투과성의 경우와 마찬가지로 큰 차이를 나타내지 않아 각 추출물 50 mg/kg 이상에서는 활성도에 큰 영향이 없음을 알 수 있었다. 그러나 용매별로 비교적 큰 차이를 보여 에탄올 추출물의 경우에 뚜렷한 억제효과를 보였다(Fig. 3).

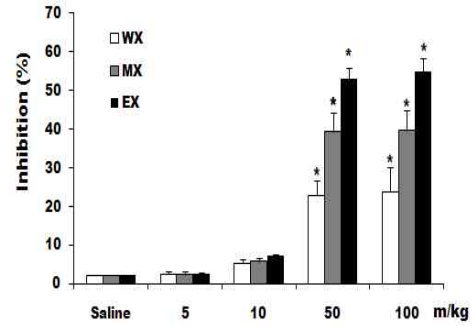


Fig. 3. Inhibition effects of BCXs on trypsin-induced MPO activity in the paw of rats. BCX: Extract of Betulae Cortex. WX: water ex. of Betulae Cortex, MX: 80% methanol ex. of Betulae Cortex, EX: 80% ethanol ex. of Betulae Cortex. Rats (SD, male, 180±20 g) were administered saline or BCXs orally 1 h prior to subplantar injection of trypsin (500 pmol). Six hrs after agonist injection, rat's paw was weighed and assessed for the MPO (myeloperoxidase) activity. Data show the mean±SE from 8-10 rats. *p<0.05 compared to the saline group.

고찰

치과질환 치료에 항생제 등의 합성약품을 장기간 사용 시 내성균주 발생이나 치면 착색 등의 여러 가지 부작용에 대한 논란이 일면서 천연약재 중에서 충치나 치주질환을 예방하거나 치료하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 이미 그 효과가 발표된 약제 이외에 새로운 천연약물을 찾는 것은 뜻이 있는 일이라고 생각된다. 화피는 한의학이론에 따라 각종 염증이나 잇몸 질환에 복용하거나 외용해오고 있어 그 효과여부를 실험한 결과 충치균 (*S. mutans*) 및 치주질환균 (*P. gingivalis*)에 대한 항균활성과 항염효과가 있음을 확인할 수 있었다.

화피를 추출하기 위하여 증류수, 80% 메탄올과 80% 에탄올을 이용하여 각기 가열 추출한 결과 수득량은 증류수 추출물이 제일 적었고 메탄올 추출물이 가장 많았다.

각 추출물의 최소발육저지농도 (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) 측정결과를 보면 ethanol추출물의 경우가 *S. mutans*와 *P. gingivalis* 모두에 대해 가장 항균력이 좋았으며 MIC (µg/ml)는 각기 100과 50이었다. 이는 方藥合編의 藥性歌 32)에 '得酒醞良'이라 하여 술을 첨가하면 더 효과가 양호하다는 내용과 맥락을 같이 한다고 보여 진다.

각 추출물 (BCX)에 대한 농도별 pH변화를 보면 *S. mutans*에 대해서는 BCX 농도가 50 µg/ml 이상의 경우 control에 비해 유의성 있는 pH의 상승을 나타내었으나, *P. gingivalis*에 대해서는 농도에 따른 유의성 있는 변화가 보이지 않았다. 이는 충치의 발생은 구강미생물이 생산하는 산에 의해 치면이 탈회되어 발생한다는 보고^{33,34)}와 일치한다고 볼 수 있으며, 치주질환 균은 산의 생성에 직접 관련성을 갖지는 않는 것으로 생각된다.

또한 trypsin으로 유발된 쥐의 발바닥부종, 혈관투과성의 활성도에서 BCX 50 및 100 mg/kg 투여 시 유의성 있는 감소율을 보였다. 이 실험에서 BCX 100 mg/kg이상의 고용량에서도 50 mg/kg의 경우와 큰 차이를 보이지는 않았다. 또한 trypsin으로 유발된 염증조직에서 조직손상에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 MPO활성을 조사하였는데, 상기 염증조직에서는 MPO활성

이 현저히 증가하였으나 BCX 투여로 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 trypsin과 같은 PAR-2 효능약의 주사로 쥐 발바닥에서 혈관투과성이 증가하여 부종으로 나타난다는 연구결과^{35,36)}와 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한 PAR-2는 neutrophil과 eosinophil에서뿐 아니라 mast cell에서도 나타난다는 보고^{37,38)}와, 이러한 반응들은 PAR-2가 endothelial cell 뿐 아니라 neutrophil과 eosinophil과 같은 mast cell 이외의 조직 함유물에서도 나타나며, 이는 쥐의 발바닥에서 trypsin과 같은 PAR-2 효능약이 조직의 투과성과 부종 증가의 원인이 된다는 주장³⁹⁾에 근거하는 것으로 이해 할 수 있다. 이를 차단하기 위한 일환으로 BCX를 투여하면 trypsin으로 유발된 PAR-2의 생성을 억제함으로써 항염증효과를 나타내는 것으로 보인다. 그러나 화피의 어떤 성분이 이러한 효과를 나타내는 지에 대해서는 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

樺皮(Betulae Cortex)의 용매별 수득량은 80% methanol로 추출할 때가 가장 많았다. 용매별로 얻어진 추출물을 이용하여 충치균 (*S. mutans*) 및 치주질환균 (*P. gingivalis*)에 대하여 MIC 측정법으로 항균효과를 측정한 결과, 각 균 모두가 에탄올 추출물 (BCX)의 경우에 가장 항균효과가 컸다. pH 변화를 조사한 결과 *S. mutans*에 대하여 BCX 50 µg/ml 이상의 농도에서 pH 값이 유의성 있게 높아졌으나 50 µg/ml 이상의 농도에서는 큰 변화를 나타내지 않았으며, *P. gingivalis*에 의한 pH값의 변화에서 유의성은 없었다.

또한 proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)에 의한 흰쥐 뒷발바닥 부종모델에서 BCX를 경구 투여한 경우, trypsin으로 유발된 발바닥 부종, 혈관투과성, myeloperoxidase 활성화에서 모두 유의성 있는 억제율을 보여 항염증 활성이 뚜렷함을 나타냈다. 이런 결과로 보아 화피는 충치예방 및 염증질환 치료에 효과가 있는 약물임을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청. 대한약전외한약규격집. 서울, 동원문화사, p 401, 2007.
2. 한국약용식물학연구회. 종합약용식물학. 서울, 학창사, p 140, 2002.
3. Li, J., Wang, X., Zhou, S. Studies on the chemical constituents of the bark of *Betula platyphylla*. *Zhong Yao Cai*, 21: 83-85, 1998.
4. Akihisa, T., Takamine, Y., Yoshizumi, K., Tokuda, H., Kimura, Y., Ukiya, M., Nakahara, T., Yokochi, T., Ichiishi, E., Nishino, H. Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products. *J Nat Prod*. 65: 278-282, 2002.
5. Matsuda, H., Ishikado, A., Nishida, N., Ninomiya, K., Fujiwara, H., Kobayashi, Y., Yoshikawa, M. Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg Med Chem Lett*. 8: 2939-2944, 1998.
6. 김창민의. *완역중약대사전*. 서울, 정담, pp 6382-6385, 1998.
7. 한방약리학교재편찬위원회. *한방약리학*. 서울, 신일북스, p 239, 2010.
8. 한의과대학본초학편집위원회. *본초학*. 서울, 영림사, p 741, 2006.
9. Lee, K.Y., Cho, H.S., Yoon, J.W., Hae, T.R. Study on the development of preventive agent of dental caries from biological active materials. I. Development of disc PAHA for an artificial tooth and preventive effect on dental caries from plant extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng*. 8: 126-132, 1993.
10. Jeong, M.J., Kim, I.H., Choi, C.W. Associations between microbiological presence, pH, and buffer capacity of the saliva and caries in clinical survey. *Oral Biol Res*. 28(2): 73-82, 2004.
11. Hardie, J.M., Whiley, R.A. The genus *Streptococcus*-Oral. In *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp 1421-1449, 1992.
12. Harty, D.W.S., Oakey, H.J., Patrikakis, M., Hume, E.B.H., Knox, K.W. Pathogenic potential of lactobacilli. *Int J Food Microbiol*. 24: 179-189, 1994.
13. Offenbacher S. Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol*. 78(10):1911-1925, 2007.
14. Gurenlian, J.R. The role of dental plaque biofilm in oral health. *J Dent Hyg*. 81(5):116, 2007.
15. Sreenivasan, P.K., Gaffar, A. Antibacterials as anti-inflammatory agents. Dual action agents for oral health. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(3):227-239, 2008.
16. Noda, D. Relationship between the presence of periodontopathic bacteria and the expressing of chemokine receptor mRNA in inflamed gingival tissue. *J Periodontal Res*. 42(6):566-571, 2007.
17. Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 53: 245, 2001.
18. Molino, M., Barnathan, E.S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J.A., Schechter, N., Woolkalis, M., Brass, L.F. Interactions of mast cell tryptase with thrombin

- receptors and PAR-2. *J Biol Chem.* 272: 4039-4043, 1997.
19. Emilsson, K., Wahlestedt, C., Sun, M.K., Nystedt, S., Owman, C., Sundelin, J. Vascular effects of proteinase-activated receptor-2 agonist peptide. *J Vasc Res.* 34: 267-272, 1997.
 20. Hou, L., Kapas, S., Cruchley, A.T., Macey, M.G., Harriott, P., Cinni, C., Stone, S.R., Howells, G.L. Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin; receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology*, 94: 356-362, 1998.
 21. Steinhoff, M., Vergnolle, N., Toung, S.H., Tognetto, M., Amdesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A. and Bunnett, N.W. Agonists of protease-activated receptor-2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med.* 6: 151, 2000.
 22. Huh, J.E., Baek, Y.H., Kim, Y.J., Lee, J.D., Choi, D.Y., Park, D.S. Protective effects of butanol fraction from *Betula platyphylla* var. *japonica* on cartilage alterations in a rabbit collagenase-induced osteoarthritis. *J Ethnopharmacol.* 123: 515-521. 2009.
 23. Manez, S., Recio, M.C., Giner, R.M., Rios, J.L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol.* 334: 103-105, 1997.
 24. Ju, E.M., Lee, S.E., Hwang, H.J., Kim, J.H. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sci.* 74: 1013-1026, 2004.
 25. Cho, Y.J., Huh, J.E., Kim, D.Y., Kim, N.J., Lee, J.D., Baek, Y.H., Cho, E.M., Yang, H.R., Choi, D.Y., Park, D.S. Effect of *Betula platyphylla* var. *japonica* on proteoglycan release, type II collagen degradation, and matrix metalloproteinase expression in rabbit articular cartilage explants. *Biol Pharm Bull.* 29: 1408-1413, 2006. .
 26. Gong, Y., Raj, K.M., Luscombe, C.A., Gadawski, I., Tam, T., Chu, J., Gibson, D., Carlson, R., Sacks, S.L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.* 64: 127-130, 2004.
 27. Pyo, J.S., Roh, S.H., Kim, D.K., Lee, J.G., Lee, Y.Y., Hong, S.S., Kwon, S.W., Park, J.H. Anti-cancer effect of Betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem Mass Spectrometry. *Planta Med.* 75: 127-131, 2009.
 28. Lorian, V. *Antibiotics Laboratory Medicine.* Williams & Wilkins, Baltimore, pp 17-105, 1991.
 29. Murray, P.R., Jorgensen, J.H. Quantitative susceptibility test methods in major united states medical center. *Antimicrob Agents Chemother.* 20: 66-70, 1981.
 30. Katayama, S., Shionoya, H., Ohtake, S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol Immunol.* 22(2):89-101, 1978.
 31. Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 78(3):206-209, 1982.
 32. 황도연. *대역중맥방약합편.* 서울, 남산당, p 157, 1984.
 33. Miller, W.D. *Die Microorganismem des Mundhohle.* Leipzig, p 209, 1989.
 34. Miller, W.D. New theories concerning decay of teeth, *D Cosmos.* 47: 1293, 1905.
 35. Kawabata, A., Kureda, R., Imnami, T., Kataka, K., Taneda, M. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hind paw. *Br J Pharmacol.* 125: 419-422, 1998.
 36. Vergnolle, N., Macnaughton, W.K., Al-Ani, B., Saifeddine, M., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D. Proteinase-activated receptor- 2-activating peptides; identification of a receptor that regulates intestinal transport. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95: 7766-7771, 1998.
 37. Howells, G.L., Macey, M., Chinni, C., Hou, L., Fox, M.T., Harriott, P., Stone, S. Proteinase-activated receptor-2; expression by human neutrophils. *J Cell Sci.* 110: 881-887, 1997.
 38. Nystedt, S., Ramakrishnan, B., Sundelin, J. The proteinase-activated receptor-2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 271: 14910-14915, 1996.
 39. Vergnolle, N., Hollenberg, M.D., Sharkey, K.A., Wallace, J.L. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) -activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol.* 127: 1083-1090, 1999.