J. Fd Hyg. Safety 14(1), 22 - 26(1999)

Natural Hesperidin이 치아 우식증과 치조골 흡수에 미치는 영향

김가영† · 송우식 · 최용현 · 백경식
중문의과대학 부속분당차병원 치과학교실

Antimicrobial Effect of Hesperidin on Dental Enamel Decalcification and Alveolar Bone Loss

Kaa-yeong Kim†, Woo-Sik Song, Yong-Hyun Choi and Kyung-Sik Baek
Department of Dental Clinic,College of Medicine, Pochon CHA University, Sungnam 463-070, Korea

ABSTRACT — The purpose of this experiment was to examine the antimicrobial effect of the natural flavonoid hesperidin on dental caries and alveolar bone resorption in the albinorats. Twenty five day old male rats were fed with the experimental diets for 42 days. At the end of the 42 day experimental period, the molar tooth occlusal surface was examined by a dissecting microscope. The sulcular caries lesions were recorded: the first molar caries incidence was higher than that of the second molar and the third molar. Alvelolar bone resorption was measured on the buccal and lingual aspects of each molars. Three measurements were taken on the first molar (mesialpoint, midpoint, distalpoint). The results of this experiment, showed that hesperidin is effective in reducing dental caries and alveolar bone resorption.

Key words □ Hesperidin, Antimicrobial effect

자연계에 널리 분포되어 있는 bioflavonoid 중 hesperidin는 naringin과는 반대로 맛을 지니고 있지않는것이 특징 이며 주로 감귤, 레몬과류와 기타식물류에 광범위하게 존재한다.[2,8]

Szent gyorgyi[26]가 처음으로 citrus fruits의 껍질에서 citrin이라는 bioflavonoid 물질을 분리하여 petechial hemorrage를 감소 시키는데 효과적이라는 보고를 하였다. Scarborough와 Stewart[23]는 capillary fragility에 hesperidin이 미치는 영향을 연구하여 hesperidin이 비타민 결핍 환자에서 모세혈관 출혈을 감소시킬뿐아니라 구강내로 투여한경우 비타민 결핍증 환자에서 petechial hemorrage가 조절되었다고 하였다. Pearson1,[8] Socransky[24]는 구강내로 복용해도 이 bioflavonoid 복합물들은 인체에 아무런 해가 없다고 발표하였으며, Rapaport[21]는 알러지 소아환자의 capillary fragility 테스트에서 hesperidin을 6개월간 두여한 결과 capillary fragility가 정상으로 돌아오는 것을 보고하면서 hesperidin은 정상적인 모세혈관의 투과성을 유지시키는데 중요한 성분이라고 하였다.

Robbins[20]은 hesperidin과 같은 flavonoids와 비타민C를 같이 투여하였을 때 혈관내 적혈구 응집을 현저하게 억제시키는 효과가 있다고 하였고, Boines[3]는 poliomyelitis 환자에서 capillary integrity를 증가시키는 효과가 있다고 하였다. Rinehart[19]는 동물실험을 통하여 hesperidin과 같은 bioflavonoid는 intracutaneous hyaluronidase을 증가시켜 병소 확산을 억제시키어 rheumatic fever 치료에 효과가 있다고 하였다.

Stralfors,[25] Formica[7]는 몇 가지 flavonoids 복합물들과 관련된 aglycone form(naringin, hesperidin, quercetin)들이 활동성 충치 이환율이 높은 사람의 타액에서 산형성을 억제시킨다고 보고하였다. Terezhalmy 등[27]은 ascorbic acid와 수용성 bioflavonoid 복합물이 구강 점막 궤양 이나 재발성 herpes labialis에서 gingival hemorrage를 감소시킬뿐 아니라 치료의 효과도 있음을 발표하였다. Harry[9]는 citrus bioflavonoid가 잇몸출혈 과 모세혈관 손상 상태에 우수한 효과가 있다고 발표하였다.

Tsuchiya[28]는 plant flavonon이 충치발생 균 성장을 억제하는 효과가 있음을 발표하였고 Chung과[6] Limasset[14]는 flavonoid가 치은 섬유아세포의 활동을 항진시켜 항염증 효과가 있음을 발표하였다. 최근에는 Ameer[1] 등과 Masao[16]가 naringin, hesperidin과 citrus를 투여후 장내에서의 흡수율을

† Author to whom correspondence should be addressed.

실험하여 flavanone 의작용기전을 연구하였으며, Calomme[4]는 naringin, hesperidin nobileletin, tangeretin과 같은 citrus flavonoids가 세균성 돌연변이를 억제하여 항암제로서의 역할을 한다고 하였다. Kometani와 Nishimura[13] 등은 호염기성 막대균종 으로부터 cyclodextrin glucanotransferase에 의한 neohesperidin glycosides와 naringin glycosides의 생화학적 합성을 연구하였으며 Heise[11]과 Masso[16]는 식물에서 추출한 flavonoid 복합물이 구강내 *Streptococcus mutans, Candida albicans*와 같은 세균에 항균효과가 있음을 보고하였다. Havsteen[10]의 연구에 의하면 자연계에서 생산되는 flavonoids가 잇몸출혈과 치주염및 여러 가지 구강질환의 치료용제제로 응용될 수 있을 뿐만 아니라 구강암의 보조적인 치료가능성이 제시되었다. 저자는 전보[12]에서 bioflavonoid 중 narigin이 충치 및 치주질환 발생의 억제 효과에 대하여 보고하였으며 이번에는 naringin과 같은류의 hesperidin으로 실험한 결과, 충치발생억제 및 치조골 흡수억제효과에 대한 양호한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서 사용한 실험동물은 알비노 rat 생후 21일, 무게가 50 그람인 Sprague dawley로서 기본 사료는 Table 1과 같고 여기에 hesperidin 0.6%를 혼합하였다. 실험 동물쥐 사육은 바닥면이 스덴레스 철망으로 된 실험장 하나에 두 마리 씩 키웠으며 동물 도착 후, 처음 4일 동안은 환경 적응을 위해서 상품사료와 수돗물을 공급하였다. 사료 그릇에 사료를 매일 채워주었고 동물들은 일주일에 두 번 씩 체중을 측정하였다. 사육실은 자동 조절 장치에 의하여 24시간 밤과 낮이 자동조절되도록 하였고 일정한 항습(온도 67°C, 상대습도 50%)의 실험 조건을 유지 할수있도록 하였다.

충치검사법

충치는 Keys method[12]를 응용하여 검사하였으며, 다음과 같이 점수로 표기하였다.

Table 1. Ingredients of basal diet

Ingredient	Percentage (%)
Casein	20.0
Corn oil	10.0
Corn starch	30.4
Sucrose	30.0
Mineral mixture	3.0
Vitamin mixture (see Table 2)	1.0
Of either naringin to the other three diets	5.6

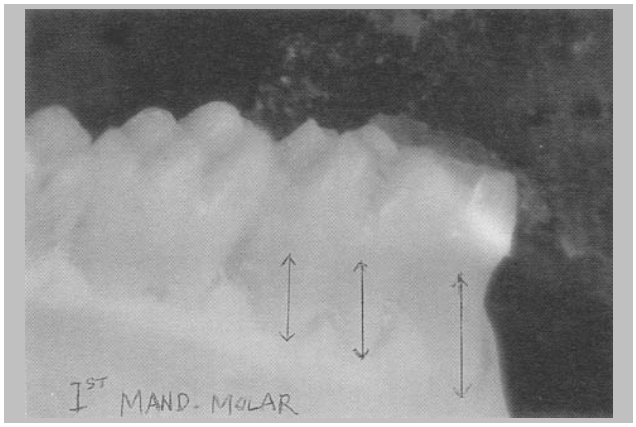

Fig. 1. Sites of alveolar bone loss measurements.

0-no caries lesion
1-decalcification enamel
2-enamel caries
3-dentin caries

치조골 파괴 측정법

치조골 파괴는 Keys와 Gold 의 방법으로 평가하였으며 에나멜과 백아질의 경계 부위에서 치조골 정상까지의 거리를 recticle dissecting microscope로 측정하였다. 제일대구치에서는 mesialpoint, midpoint, distalpoint를 측정하였다 (Fig. 1).

치조골 파괴 측정을 위하여 실험동물의 머리를 절단한 다음 두개골로부터 연조직을 제거하기 위하여 20분간 고압멸균기 에서 삶은 후에 발골하였다. 분리한 악골은 2:1 methanolchloroform 용액에 24시간 침지하였다가 다시 3% hydrogen peroxide 용액에 15분간 침지후 건조시켰다.

실험결과 및 고찰

Hesperidin의 체중에 미치는 영향

실험기간중 실험동물의 체중변화를 비교한 결과는 Table 2와 같으며 hesperidin은 실험한 쥐의 체중에 영향을 주지 않았고, 대조군과 hesperidin 첨가군 사이에는 통계적 유의차가 나타나지 않았다.[22]

Hesperidin의 충치억제효과

실험동물 40마리를 대조군 20마리와 실험군 20마리로 구분하여 사육한 다음, 열구충치병소를 highspeed diamond disc로 절단하여 mesiodistal sagittal plan으로 세로 절단하여 관찰하였다. 대부분의 충치부위는 실험군이나 대조군이나 동일하게 대구치의 교합면 열구부위에서 발견되었으나

Table 2. Body weight response

Days on diet	Control	Hesperidine
0	65±1.58	66±1.58
7	100±2.53	102±2.21
14	133±4.11	142±2.85
21	163±4.43	178±6.64
28	222±3.79	223±6.01
35	273±4.43	274±6.64
42	303±5.06	307±8.54

Mean±S.E. (in gram)

일차적으로 실험하였던 naringin그룹의 결과와 함께 t-test를 비교해 본 결과, 일차실험 naringin에서는 유의성을 나타내지 않았으나 hesperidin 에서는 상악에서 19.2%의 유의성을 나타내었다(0.01<p<0.05). 충치가 가장 많이 나타난 부위는 제일대구치였고, 가장 낮은 충치발생부위는 제3대구치였다. 특히 상악 대구치에 더 충치 감수성이 높았고, 병소는 황갈색이나 짙은 갈색으로 깊은 열구를 따라 나타났다. 제일대구치의 대부분에서 sulcular lesion은 상아질내로 침투되어 있었고 모든 충치병소 부위에는 음식 잔유물로 채워져 있었다. 동일한 방법으로 인접면 충치 부위도 관찰하였으나 병소를 발견하지 못했다(Table 3, 4). Lisanti와 Eichel[15]은 0.01% bioflavonoid를 hamster 에 투여한 결과 제 1대구치 제 2대구치에서 대조군 보다 실험군이 80-83%충치억제 효과가 있는 것으로 나타났고, Thomson은 0.5% bioflavonoid를 투여한 결과 제 1 대구치 제2대구치에서 충치 억제효과가 없는 것으로 나타났다.

Hesperidin의 치조골 파괴억제 효과

Morton과 William[17]은 69명의 호흡기감염 질환을 갖고 있는 환자에게 300 mg 수용성 citrus flavonoid 복합제를 투여해본 결과 8시간~48시간 후에 염증상태가 현저히 개선되었음을 보고하였고, Carvel과 Halperin[5]는 치은 출혈을 동반한 혈액질환이 있는 환자 13명을 대상으로 매일 200 mg 수용성 bioflavonoid와 200 mg의 ascorbic acid를 10개월간 투여한결과 치은염증과 병소가 현저하게 치유됨을 보였다. Terezhalmy와 Bottomen, Pelleu[28]는 50명의 재발성 Herpes labiallis 환자를 선정하여 매일 600 mg의 수용성 bioflavonoid와 600 mg의 ascorbic acid를 같이 투여한 실험군과, 20명에게 매일 1000 mg 수용성 bioflavonoid와 1000 mg ascorbic를 투여한 실험군을 대조군과 비교해본 결과 치유기간이 대조군은 9.7±2.8일에서 실험군은 4.2±1.7일로 단축되어지는 치유효과를 나타내었다.

Table 4. Statistical analysis of occlusal caries on first molars

Groups	Mean±S.E index	t-value	p-value
Max control	2.60±0.145	2.157	0.01<p<0.05
hesperidin	2.15±0.150		
Man control	2.30±0.133	1.598	p>0.05
hesperidin	1.95±0.174		

본 실험에서 Hesperidin의 치조골 흡수에 미치는 영향을 검토하기 위하여 기초 Diet에 Hesperidin 0.6%를 첨가하여 42일간 급여한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

대조군의 치조골 협측면 흡수가 Mesial point길이는 상악 좌우 협측면에서 19.2 mm였는데 비하여 Hesperidin 첨가군의 것은 16.4 mm로서 Hesperidin 첨가에 의하여 15% 감소

Table 5. Alveolar bone loss on first molars
(meseal, midpoint, distal) Mean±S.E.(in unit 24 units=1 mm)

Group			Control	Hesperidin	Change (%)
Mesial point	Mx	B	19.2±0.38	16.4±0.45	15%
		L	21.8±0.63	17.85±0.27	18%
	Mn	B	17.1±0.76	15.05±0.76	12%
		L	34.5±0.55	30.0±0.66	13%
Mid point	Mx	B	12.4±0.39	9.6±0.23	23%
		L	16.6±0.83	12.7±0.56	23%
	Mn	B	11.5±0.41	8.05±0.25	30%
		L	24.4±0.63	21.0±0.4	14%
Distal point	Mx	B	11.4±0.36	8.25±0.21	28%
		L	13.6±0.50	10.5±0.4	23%
	Mn	B	10.2±0.18	7.45±0.24	27%
		L	20.1±0.74	15.4±0.6	23%

B: buccal, L: lingual

Table 3. Occlusal caries on maxillary and mandibular teeth

Dietary groups	Max			Man		
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
Control Right	2.4±0.27	1.9±0.23	1.3±0.15	1.9±0.23	1.4±0.27	0.9±0.18
Left	2.8±0.13	2.1±0.23	1.3±0.15	2.7±0.15	2.1±0.18	1.2±0.20
Hesperidin Right	2.4±1.6	1.6±0.16	1.2±0.13	2.0±0.21	2.0±0.21	1.2±0.20
Left	1.9±0.18	1.5±0.22	1.3±0.15	1.9±0.18	1.8±0.25	1.2±0.13

Mean±S.E.(index)

하였고, 상악좌우 설측면에서는 21.8 mm에서 17.8 mm로 18% 감소하였다.

하악에서도 이와 유사하게 협측면 흡수가 17.1 mm에서 15.05 mm로 12% 감소하였고, 설측면에서는 34.5 mm에서 30.0 mm로 13% 감소하였다.

Midpoint 길이는 상악좌우 협측면에서 12.4 mm에서 9.6 mm로 23% 감소하였고, 설측면에서는 16.6 mm에서 12.7 mm로 23% 감소하였다. 하악에서도 협측면은 11.5 mm에서 8.05 mm로 30% 감소를 설측에서는 24.4 mm에서 21.0 mm로 14% 감소를 보였고, distal point에서는 상악좌우협측면에서 11.4 mm에서 8.25 mm로 28% 감소를, 설측면에서는 13.6 mm에서 10.5 mm로 23% 감소를 보였고. 하악에서는 좌, 우 모두 협측면에서는 10.2 mm에서 7.45 mm로 27% 감소를 설측에서는 20.1 mm에서 15.4 mm로 23% 감소함을 보였다(Table 5). 이로 미루어 Hesperidin이 충치 특히, 상악치아에도 통계적유의성을 나타냈을 뿐 아니라 치주질환으로 인한 치조골파괴 예방에도 효과가 있는 것으로 보아 Bioflavonoid와 구강질환에 대한 계속적인 비교연구가 필요하다고 생각한다.

국문 요약

Bioflavonoid Hesperidin이 치아우식증과 치주질환에 미치는 영향을 평가하기 위하여 생후 25일된 흰쥐를 실험동물로 사용하여 42일간 Hesperidin 함유 사료로 사육하면서 실험군과 대조군의 치아범랑질층 탐침과 치조골 흡수를 측정관찰하여 Hesperidin이 치아우식및 치주질환에 미치는 효과을 평가하였다. 상악대구치 교합면의 열구충치부위 병소에 있어서는 대조군에 비하여 실험군의 제1대구치가 제2대구치 제3대구치보다 약 20% 억제되었고, 하악대구치의 경우에는 제1대구치가 제2 대구치, 제3 대구치보다 15% 억제되었다. 치조골의 흡수량도 대조군에 비하여 실험군이 상악에서는 약 22%, 하악대구치에서는 20% 억제효과가 나타났다.

참고문헌

1. Ameer, B., Weintraub, R.A., Johnson, J.U., Yost, R.A. and Rouseff, I.K.: Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin. Pharm. Therap.* **60**, 34 (1996).
2. Biswas, A.: Further studies on the sensitivity of plant pathogenic microorganisms towards some naturally occuring chalcones and flavanones. *Experientia* **37**, 397 (1901).
3. Boines, G.J.: A rationale for the use of hesperidin and ascorbic acid in the management of poliomyelitis. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, p. 720 (1954).
4. Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A. and Vanden, B. D.: Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. *Planta Media.* **62**, 222 (1996).
5. Carvel, R.I. and Halperin, V.: Therapeutic effect of water-soluble bioflavonoids in gingival inflammatory conditions. *Oral surg.* **14**, 847 (1961).
6. Chung, C.P., Park, J.B. and Bae, K.H.: Pharmacological effect of methanolic extract from the root of Scutellaria baicalenesis and ita flavonoids on human gingival fibroblast. *Planta Medica.* **61**, 150 (1995).
7. Formica, J.V. and Regelson, W.: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food & Chem. Toxic.* **33**, 1061 (1995).
8. Gumbmann, M.R.: Toxicity studies of neohesperidin dihydrochalcone. Sweetner & Dental Caries. p.301.
9. Harry Roth, B.S.: Preliminary progress report of a clinical study of the effect of c.v.p. on gingival hemorrhage. *O.S., O.M. & O.P.* **10**, 590 (1957).
10. Havsteen, B.: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharm.* **32**, 1141 (1983).
11. Heiseys, R.M.: Antimicrobial effects of plant extract on Streptococcus mutans, Candida albicans, Trichophyton rubrum and other micro-organisms. *Letters in Appl. Micro.* **14**, 136 (1992).
12. Kim, K.Y.: Effect of naringin to dental caries and periodontal disease. *J. Fd. Hyg. Safety.* **12**, 102 (1997).
13. Kometan, T. and Nishimura, T.: Synthesis of neohesperidin glycosodes and naringin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic bacillus species. *Biosci. Biotech. & Biochem.* **60**, 645 (1996).

14. Limasset, B., Ie Doucen, C., Dore, J.C., Ojasoo, T., Damon, M., Crastes, de Paulet A.: Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. *Biochem. Pharm.* **46**, 1257 (1993).
15. Lisanti, V.F. and Eichel, B,: Antioxidant inhibition of experimentally induced caries in hamster. *J. Dent. Res.* **42**, 1030 (1963).
16. Masao, H., Tomoco, K., Tsuneo, N., Tadashi, I. and Yukihiko, H.: Effect of Tea polyphenols on Glucan Synthesis by Glucosyltransferase from streptococcus mutans. *Chem. Pharm. Bult.* **38**, 717 (1990).
17. Morton. S.B. and William, C.M.: The use of citrus flavonoids in infection. *Am. J. Dig. Dis.* **2**, 41 (1955).
18. Pearson, W.N.: Flavonoids in human nutritin and medicine. *J. A. M. A.* **164**, (1957).
19. Rinehart, J.: Rheumatic fever observation on the histogenesis, pathogenesis, and use of ascorbic acid bioflavonoids. *J. Clin. Invest.* **23**, 941 (1951).
20. Robbins, R.C.: Methoxylated phenylbenzom-γ-pyrone derivatives flavonoids that highly inhibit erythrocyte aggregation. *Clin. Chem.* **17**, 1109 (1971).
21. Rapaport. K.: VitaminPand capillary fragility. *J. Pediat.* **18**, 321 (1941).
22. Robert. H. and Floyd. D.: Effect of naringin and hesperidin on albino rats. *Food Res. Div. Contrib.* **44**, 89 (1939).
23. Scarborough, H. and Stewart, C.P.: Effect of hesperidin on capillary fragility. *Lancet.* **10**, 611 (1938).
24. Socransky, S.S.: Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of actinomyces naeslundi. *Archs. Oral. Biol.* **15**, 993 (1970).
25. Strelfors, A.: Inhibition of hamster caries by phenolic compounds. *Archs. Oral Biol.* **12**, 1375 (1967).
26. Szent, G.: Flavonols as vitamins. *Nature.* **138**, 27 (1936).
27. Terezhalmy, G.T., Bottomley, W.K. and Pelleu, G.B.: Accelerated remission of episodes of herpes labialis in response to a bioflavonoid ascorbate supplement. *Nutri. Rev.* **36**, 301 (1978).
28. Tsuchiya. H.: Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavonones. *Experientia.* **50**, 846 (1994).