

오배자가 구강에서 분리된 미생물에 대한 항균효과 및 구강 편평세포암종 KB 세포에 미치는 영향

이영선 · 한옥경 · 배만종 · 김광중 · 신상우¹ · 이송권² · 박종현^{1*}

(재)경북테크노파크, 대구한의대학교 한방생명자원특화센터 효능검증원,
1: 대구한의대학교 한의학과 병리학교실, 2: 대구한의대학교 보건대학원

Antimicrobial and Anticancer Effects of *Galla Rhois* on Pathogens Isolated from Oral and KB Human Oral Epidermoid Carcinoma Cells

Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Man Jong Bae, Kwang Joong Kim, Sang Woo Shin¹, Song Kwon Lee², Jong-Hyun Park^{1*}

Efficacy and Safety Research Center for Traditional Oriental Medicine, Daegu Hanny University, Kyongbuk Technopark, 165,
1: Department Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, 2: Graduate School of Public Health, Daegu Haany University

This study was carried out to investigate the antimicrobial and anticancer effects of *Galla Rhois* (GR) on pathogens isolated from oral and KB human oral epidermoid carcinoma cells. Their antimicrobial activities were tested against *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Candida albicans* (*C. albicans*). GR powder has the antimicrobial activity against *C. albicans*, *S. mutans* and *S. aureus*. The extracts of water and ethanol have the antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans*. The water extract showed inhibitory activity against the growth and pH of above mentioned reference microorganisms. The water extract of GR declined cell viability in a dose dependent manner. DNA flow cytometric analysis showed that population of sub-G₀/G₁ phase of cell cycle was increased by GR extract treatment in a dose dependent manner. Western blot analysis revealed that Caspase-3 was reduced by GR extract treatment. These result suggested that GR has the effect of antimicrobial on pathogens isolated from oral, and also, has anticancer effect that associated with the induction of apoptosis in a dose dependent manner in KB human oral epidermoid carcinoma cells. It may be GR-induced apoptosis was mediated via activation of Caspase-3.

Key words : *Galla Rhois*, antimicrobial, anticancer, apoptosis

서 론

최근 생활환경의 변화 즉, 식생활에서 당류의 소비 증가 및 스트레스에 의한 면역기능의 악화 등에 의해 구강내 질환의 발생 빈도가 증대되고 있다. 구강질환의 발생요인은 숙주요인, 병원체 요인 및 환경요인 등이 균형을 잃게 될 때 특정의 구강질환을 일으킬 가능성이 높아지게 된다. 이러한 요인들 중 구강내에 존재하는 미생물이 주원인으로 보고되고 있으며¹⁻⁵⁾, 황백, 황련, 으름덩굴 추출물, 우롱차 잎 추출물 및 세신 추출물 등과 같은

천연물에서의 *Streptococcus mutans*에 관한 항균 효과들이 보고되었다⁶⁻⁹⁾. 최근 들어 구강 미생물에 의한 구강질환과 더불어 구강에서의 암 발생율이 증가되고 있음이 보고되고 있다. 구강암의 90% 이상이 상피암으로 주로 치주, 협점막, 입술, 혀, 타액선 및 인두의 전 부위 등에서 발병되는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 구강암의 치료 요법으로 수술, 방사선 요법 및 복합 화학요법 등이 주로 사용되나, 최근 특히 화학요법의 역할이 증가되고 있어 부작용이 적은 생약재나 천연물에서 구강암의 예방과 치료 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 김 등의 보고에 따르면 천연 약용식물 추출액을 이용한 구강상피암 세포주에 효과적인 항암효과를 지니는 생약재를 조사한 연구에서 소목 및 목향 추출액에서 항암효과가 보고되었다^{11,12)}.

* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 165번지, 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : moguri@dhu.ac.kr · Tel : 053-770-2248
· 접수 : 2003/09/02 · 수정 : 2003/10/27 · 채택 : 2003/11/10

한편 한의학적으로 구강질환은 風, 熱, 寒, 蟲 등의 外邪에 의하거나, 脾胃, 心, 腎의 병변이 미쳐서 발생하는 것으로 보고 있으며, 주요 病機는 風寒, 風熱, 脾胃熱盛, 心火上炎, 腎臟虧虛 등으로 나누고 이에 따라 변증 치료하고 있다¹³⁾. 또한 구강질환의 경우 吹藥, 鍼刺, 舍法, 漱法, 外敷法 등의 外治法을 많이 활용하고 있으며¹⁴⁾, 특히 白蟻이나 五倍子 등을 외용약으로 많이 사용하고 있다. 오배자는 붉나무 (*Rhus chinensis* Mill)의 잎날개에 오배자 진드기(*Melaphis chinensi* Baker)가 기생하여 만들어진 충영으로, 예로부터 맛이 酸澁하여 수렴시키는 효능이 있어 내복하면 肺虛로 인한 오래된 기침과 오래된 설사를 치료하며, 外用하면 濕熱로 인한 瘡瘍, 疥癬과 상처가 아물지 않는 것에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 오배자에 함유된 탄닌산에는 단백질 침전시키는 작용이 있기 때문에 피부 점막 궤양에 탄닌산에 접촉되면 조직 단백질이 즉시 응고되며 피막을 형성하여 수렴 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

오배자에 대한 연구보고를 살펴보면 항산화 효과, 항혈전 효과 및 항균 효과에 관한 연구는 보고되어 있으나, 구강미생물 및 구강암에 관한 연구는 미흡한 실정이다¹⁶⁻¹⁹⁾.

따라서, 본 연구는 오배자의 구강내 미생물 및 구강 편평세포포암종 KB 세포에서 항균 및 항암 효과에 관한 연구를 통하여 구강질환의 예방과 치료를 위한 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료 조제

본 실험에 사용된 오배자는 구입하여 건조한 후 분말 상태를 만들었으며, 오배자의 물추출액과 에탄올 추출액의 경우 100 mg/ml의 분말을 24시간 녹인 후 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 모아 0.2 μ m filter를 이용하여 여과하여 사용하였다. 항암효과를 조사하기 위하여 오배자를 PBS buffer를 사용하여 100 mg/ml 농도가 되게 24시간 녹인 후, 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 모아 0.2 μ m filter를 이용하여 여과하여 사용하였다.

2) 실험대상 미생물

이 실험의 대상 미생물은 대표적인 구강, 기관지염증에 관련된 미생물인 *S. mutans* (KTCC 3065), *C. albicans* (KTCC 7965), *E. aerogenes* (KTCC 2190), *S. aureus* (KTCC 1621), *E. coli* (KTCC 1039)을 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받아 사용하였다.

3) 세포주 배양

구강암세포는 (mouth carcinoma cell : KB) 한국 세포주 은행에서 분양 받아 RPMI 1640에 10% FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin이 함유된 배지에 배양하면서 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 원관확산법

배양된 각 시험 균주를 한백금이씩 취해 각 균주의 액체 배

지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 이 배양액 0.1 ml를 Muller Hinton 액체배지에 접종하여 18시간 배양 후 멸균 면봉을 이용해서 Muller Hinton 한천배지에 균일하게 도포 시켰다. 각 시험균이 도포된 배지위에 0.8 mm filterpaper disc를 올려놓은 후 37°C에서 24시간 동안 배양 후 disc 주위에 나타나는 clear zone (mm)으로 항균성을 비교하였다.

2) 증식 저해 정도 측정

배양된 각 시험 균주를 한백금이씩 취해 각 균주의 액체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 이 배양액 0.1 ml를 각 추출물이 농도별 (0.1, 1, 10 mg/ml)로 함유된 액체배지에 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 추출물의 농도별 항균 효과는 미생물의 생육정도를 Spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 추출물을 넣은 액체배지를 blank로 사용하였다.

3) pH 변화 측정

배양된 각 시험 균주를 한백금이씩 취해 각 균주의 액체 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 이 배양액 0.1 ml를 각 추출물이 농도별 (0.1, 1, 10 mg/ml)로 함유된 액체배지에 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 추출물의 농도별 pH 변화를 측정하기 위해 배양액을 3,000 rpm 10분간 원심 분리하여 pH meter를 이용하여 측정하였다.

4) 생존 세포수 산정

오배자 처리에 의한 구강편평세포포암종 KB세포에 미치는 영향을 검토하기 위해 먼저 준비된 시료를 RPMI 1640 배양액에 100, 250 및 500 μ g/ml이 되도록 처리하였다. 이들 각각 상이한 농도가 함유된 배양액을 24시간 배양 후 회수하여 세포에 trypan blue가 0.2% 되도록 첨가한 후 hemocytometer를 이용하여 생존 세포수를 산정 하였는데, 각 측정시 마다 3회씩 실시하여 생존세포수의 평균치 및 표준편차를 구하였다.

5) 세포 형태 관찰

오배자 처리에 의한 구강 편평세포포암종 KB 세포에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 처리 액을 100, 250 및 500 μ g/ml 농도가 되도록 하여 24시간 배양 후 세포의 형태를 각각 광학 현미경 (MPS-30, Leica, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

6) 세포사멸 분석 (Flow cytometer)

구강 편평세포포암종 KB 세포에 오배자를 처리에 하여 24시간 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS, Ca²⁺, 2% FBS)에 800 rpm으로 5분간 세척 후 100 μ l의 PBS에 부유시킨 후 100% EtOH 200 μ l를 가하여 세포를 고정한 후 4°C에서 1시간 이상 방치하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 50 μ g/ml의 RNase A를 250 μ l 첨가 한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 50 μ g/ml의 propidium iodide를 250 μ l 첨가하여 20분간 배양한 후 Flow cytometer (Becton Dickson Co.)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

7) 단백질 발현(Western blotting)

세포에서의 단백질 분리는 lysis buffer (50mM Tris-Cl, 25mM EDTA, 650mM NaCl, 5% Triton X-100, 100 \times PMSF, 100 \times protease inhibitor cocktail, 5 \times lysis buffer)를 이용하여 분리

하였다. 추출된 단백질을 95℃에서 5분간 가열한 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후 Protran[®] nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 5% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 incubation하면서 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하고, Caspase-3 항체와 함께 incubation 후 ECL 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 Caspase-3단백질 발현을 조사하였다. 대조 단백질 밴드로 HSP70을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 관찰하였다.

결 과

1. 오배자의 구강에서 분리된 미생물의 항균효과

오배자 분말의 경우 *S. mutans*, *S. aureus* 및 *C. albicans*에 각각 11 mm, 16 mm 및 17 mm의 균 억제대가 관찰되었다. 오배자 물추출액의 경우 *S. aureus*와 *C. albicans*에서 각각 20 mm와 22 mm의 억제대가 관찰되었으며, 에탄올 추출액의 경우에서도 *S. aureus*와 *C. albicans*에서 각각 20 mm와 22 mm의 항균효과가 관찰되었다(Table 1).

Table 1. The screening of antimicrobial activity

Samples	Strains	Inhibition zone (mm)				
		<i>E.coli</i>	<i>E.aerogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>C.albicans</i>
Powder	Galla Rhois	-	-	16	11	17
	Control	-	-	-	-	-
Extract	Galla Rhois(D.W)	-	-	20	-	22
	Galla Rhois(EtOH)	-	-	20	-	22
Antibiotics	Ampicillin(10 μ g)	16	-	47	-	-
	Carbenicillin(100 μ g)	22	25	50	-	-
	Kanamycine(30 μ g)	20	21	26	20	-
	Penicilline (10IU/IE/UI)	-	-	48	30	-
	Control	-	-	-	-	-

2. 오배자의 구강미생물에 대한 증식 저해정도 측정

오배자의 *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* 그리고 *C. albicans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위해 BHI, Nutrient, Saboroud dextrose(SD) 액배지에 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도를 첨가한 후 각 균주를 한백금이씩 접종하여 37℃ 항온기에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. *E. coli*에 관한 증식저해 정도를 살펴본 결과 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 0.443±0.015의 흡광도를 나타내었고, 0.1 mg/ml의 경우 0.242±0.003, 1 mg/ml와 10 mg/ml 농도의 경우 거의 균 증식이 관찰되지 않았다. *E. aerogenes*에 관한 항균활성은 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 0.402±0.012의 흡광도를 나타내었고, 0.1 mg/ml의 경우 0.223±0.023, 1 mg/ml와 10 mg/ml 농도의 경우 거의 균 증식이 관찰되지 않았다. *S. aureus*에 관한 항균활성은 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 0.170±0.001의 흡광도를 나타내었고, 0.1 mg/ml의 경우 0.190±0.009, 1 mg/ml와 10 mg/ml 농도의 경우 거의 균 증식이 관찰되지 않았다. *S. mutans*에 관한 항균활성은 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 0.557±0.004의

흡광도를 나타내었고, 0.1 mg/ml의 경우 0.480±0.003, 1 mg/ml의 경우 0.133±0.016 의 흡광도가 관찰되었으며, 10 mg/ml의 경우 거의 균 증식이 관찰되지 않았다. *C. albicans*의 경우 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 0.638±0.017의 흡광도를 나타내었고, 0.1 mg/ml의 경우 0.649±0.005, 1 mg/ml의 경우 0.266±0.012의 흡광도가 관찰되었으며, 10 mg/ml의 경우 거의 균 증식이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

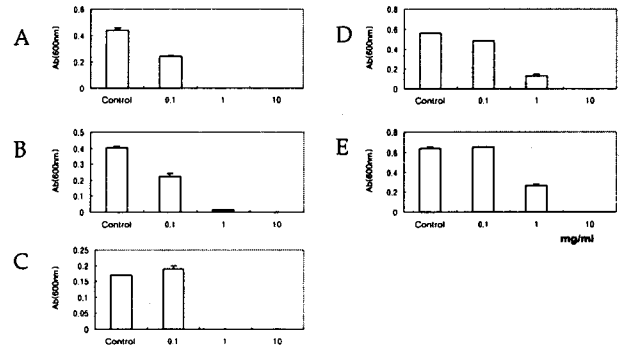


Fig. 1. Effect of Galla Rhois on growth of several oral microbials at various concentration. A : *E. coli*, B : *E. aerogenes*, C : *S. aureus*, D : *S. mutans*, E : *C. albicans*.

3. 오배자의 구강미생물에 대한 pH 변화

오배자의 *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* 그리고 *C. albicans*의 증식에서 pH 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 BHI, Nutrient, Saboroud dextrose(SD) 액배지에 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도를 첨가한 후 각 균주를 한백금이씩 접종하여 37℃ 항온기에서 24시간 배양한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 모아 pH를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. *E. coli*에 대한 pH 변화는 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 7.621±0.058, 0.1 mg/ml의 경우 7.301±0.021, 1 mg/ml의 경우 6.931±0.047 그리고 10 mg/ml의 경우 6.256±1.066로 농도가 높을수록 pH가 낮아지는 것이 관찰되었다. *E. aerogenes*에 대한 pH 변화는 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 7.260±0.022, 0.1 mg/ml의 경우 6.930±0.040, 1 mg/ml의 경우 6.617±0.008 그리고 10 mg/ml의 경우 5.182±0.056로 농도가 높을수록 pH가 낮아지는 것이 관찰되었다. *S. aureus*에 대한 pH 변화는 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 6.896±0.011, 0.1 mg/ml의 경우 6.980±0.041, 1 mg/ml의 경우 6.365±0.040 그리고 10 mg/ml의 경우 5.109±0.058로 농도가 높을수록 pH가 낮아지는 것이 관찰되었다.

*S. mutans*에 대한 pH 변화는 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 5.406±0.001, 0.1 mg/ml의 경우 5.412±0.009, 1 mg/ml의 경우 5.371±0.022 그리고 10 mg/ml의 경우 5.451±0.656로 농도가 높을수록 pH가 낮아지는 것이 관찰되었다. *C. albicans*에 대한 pH 변화는 오배자를 첨가하지 않은 대조군에서 5.083±0.017, 0.1 mg/ml의 경우 5.033±0.002, 1 mg/ml의 경우 5.189±0.012 그리고 10 mg/ml의 경우 4.827±0.043로 농도가 높을수록 pH가 낮아지는 것이 관찰되었다(Fig. 2).

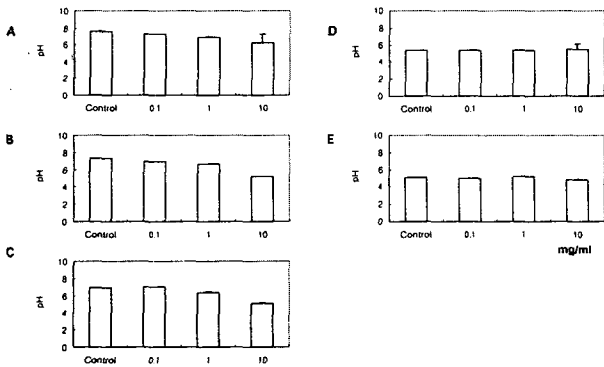


Fig. 2. Effect of *Galla Rhois* on pH of several oral microbials at various concentration. A : *E. coli*, B : *E. aerogenes*, C : *S. aureus*, D : *S. mutans*, E : *C. albicans*.

4. 오배자 물추출액의 구강 편평세포암종 KB 세포 생존 및 형태학적 변화

오배자가 구강 편평세포암종 KB세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 추출액을 편평세포암종 KB세포에 투여한 뒤 24시간이 경과한 후 세포를 회수하여 생존 세포수를 측정할 결과 檢液의 농도가 높을수록 사멸되는 세포의 수가 증가하였다(Fig. 3).

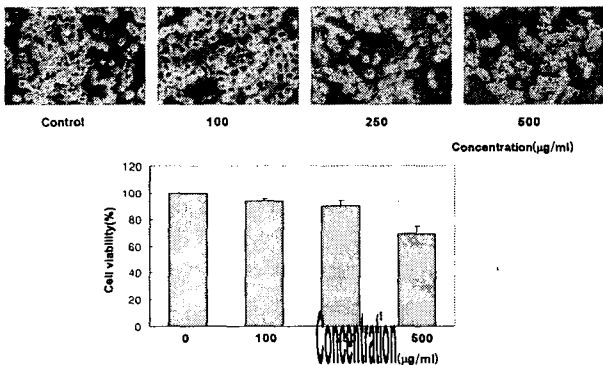


Fig. 3. Photomicrograph and cell viability of KB cells with *Galla Rhois* extract for 24 hrs. Cells were seeded as described in Material and Methods.

5. 오배자 추출액의 농도에 따른 세포주기의 변화

오배자 추출액이 구강 편평세포암종 KB세포에서 세포사멸에 관여하는지를 조사하기 위하여, 오배자 추출액을 100, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 구강 편평세포암종 KB에 각각 처리하여 24시간 후에 세포를 수확하여, 세포내 DNA를 propidium iodide로 염색하여 flow cytometer를 이용하여 세포내 DNA함량을 분석하였다. 세포사멸의 진행을 나타내는 sub-G0/G1기의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군에서 7.0 %, 오배자 추출액의 농도 100, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 에 따라 sub-G0/G1기가 7.1 %, 14.0 %, 23.7 %로 오배자 추출액의 농도가 증가할수록 증가됨이 관찰되었다(Fig. 4).

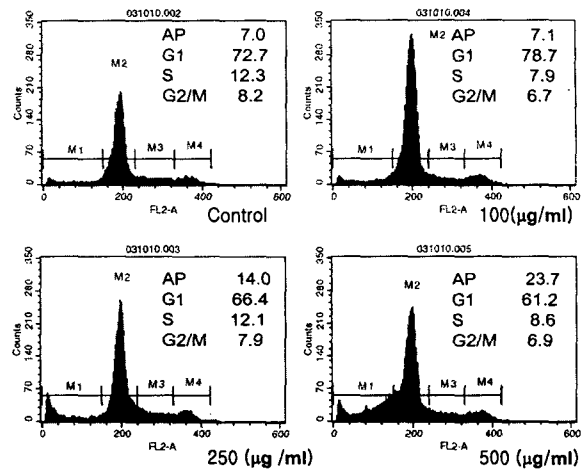


Fig. 4. Flow cytometry analysis of KB cells treated with *Galla Rhois* extract for 24 hrs. The Cells were harvested, fixed with ethanol, and stained with propidium iodide.

6. 오배자 추출액의 구강 편평세포암종 KB에서 Caspase-3 발현

오배자 추출액의 구강 편평세포암종 KB세포에서 세포사멸에 ICE/CED-like protease family 로 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는 Caspases-3의 관련성을 조사하기 위하여, 오배자 추출액을 구강 편평세포암종 KB세포에 처리하여 Caspase-3의 발현 정도를 조사하였다. 구강 편평세포암종 KB 세포에서 오배자 추출액에 의한 Caspase-3 32KDa 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, 대조군에서는 Caspase-3 32KDa의 발현이 관찰되었으나, 오배자 추출액의 처리에 의해 Caspase-3 32KDa의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

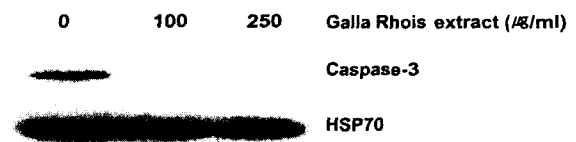


Fig. 5. Effect of *Galla Rhois* extract on the Caspase-3 protein in KB cells. Cells were incubated with *Galla Rhois* extract for 24 hrs. The protein extracts were prepared, and then the samples analyzed for Caspase-3 expression by Western blotting as described in the method. HSP70 was used as control protein.

고 찰

한방재료들은 항균제, 항염증제, 항고혈압제, 항암제 등으로 오랜 세월 사용되어 왔으며, 이러한 한방재료의 효과에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다. 이중 구강질환에 효과적인 한방재료에 관한 연구들에서 세신, 황백, 황련, 우롱차잎 등의 효과가 보고되고 있다. 구강 질환의 발생 빈도가 여러 가지 원인에 의하여 증대되고 있으며, 구강질환의 발생요인들 중 구강내에 존재하는 미생물에 의한 질환이 가장 많이 보고되고 있다. 또한 최근 들어 구강암의 발생빈도가 점점 증가하고 있어, 최근 들어 부작용이 없는 생약재나 천연물에서 이에 효과적인 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다^{6-9,20}.

한의학에서는 구강질환의 病機를 風寒, 風熱, 脾胃熱盛, 心火上炎, 腎臟虧虛 등으로 나누고 증에 따라 약물을 복용하거나 吹藥, 鍼刺, 含法, 漱法, 外敷法 등의 外治法을 함께 활용하고 있는데, 외용약으로는 해독, 살충효과가 있는 약물을 사용하거나 혹은 수습하는 작용으로 점막을 수축시키고 상처를 치유하는 효능이 있는 약물을 많이 사용한다^{13,14)}.

五倍子是 寒無毒하고 酸澁하여 수렴시키는 효능이 있어 내복하면 肺虛로 인한 오래된 기침과 오래된 설사를 치료하며, 外用하면 濕熱로 인한 瘡瘍, 疥癬과 상처가 아물지 않는 것에 효과가 있어¹⁵⁾ 『開寶本草』에는 “風濕瘡, 가렵고 고름이 나오는 증세, 소아의 面鼻疔瘡를 치료한다.”고 하였으며, 『本草衍義』 “口瘡를 치료하려면 분말을 비벼서 넣는다.”고 하였고, 『本草綱目』 “眼赤, 濕爛을 치료하고, 腫毒, 喉痺를 소실시키며 潰瘍을 수렴하고 金瘡를 치료한다.”고 하였다. 또 『東醫寶鑑』 “피부가 헐거나 버짐이 생겨 가렵고 고름 또는 진물이 흐르는 것을 짓게 하며, 어린이의 얼굴과 코에 생긴 疔瘡, 어른의 입 안이 헐 것을 치료한다.”고 하여 구강 인후 및 피부의 創傷에 광범위하게 활용하고 있는 약재이다²¹⁾.

이에 본 연구에서는 오배자를 분말형태와 물 및 에탄올 추출액을 만들어 첫째 구강에서 분리된 구강 미생물에서의 항균효과를 관찰하였다. 그 결과 오배자 분말의 경우 *C. albicans* 와 *S. mutans*, *S. aureus*에서 항균효과가 관찰되었으며, 오배자 물추출액과 에탄올 추출액에서 *S. aureus*와 *C. albicans* 균주에서 항균효과가 관찰되었다. 오배자의 *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* 그리고 *C. albicans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위해 균 증식 정도를 흡광도로 살펴본 결과 오배자의 농도가 1 mg/ml 이상일 경우 균 증식이 관찰되지 않았으며, 오배자의 *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* 그리고 *C. albicans*에 의 증식에서 pH변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대부분의 균주에서 오배자의 농도가 증가할수록 배지의 pH가 낮아지는 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 균 증식의 역제가 pH의 변화와 관련이 있을 것으로 생각된다.

최근 인체 구강유상피암세포나 인체 구강암세포주를 대상으로 구강암에 효과적인 한약재나 천연물을 찾고, 작용기전을 밝히고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다²²⁻²⁷⁾. 오배자가 구강 편평세포암종 KB세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 물추출액을 편평세포암종 KB 세포에 투여한 뒤 24시간이 경과한 후 세포를 회수하여 생존 세포수를 측정하고 檢液의 농도가 높을수록 사멸되는 세포의 수가 증가하였다. 이러한 사멸되는 세포수의 증가가 apoptosis와 관련 있는지를 살펴보기 위해, 오배자 추출액을 100, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 구강 편평세포암종 KB에 각각 처리하여 24시간 후에 세포를 수확하여, 세포내 DNA를 propidium iodide로 염색하여 flow cytometer를 이용하여 세포내 DNA함량을 분석하였다. 세포기사멸의 진행을 나타내는 sub-G0/G1기의 변화를 살펴본 결과 대조군에서 7.0 %, 오배자 추출액의 농도 100, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 에 따라 sub-G0/G1기가 7.1 %, 14.0 %, 23.7 %로 오배자 추출액의 농도가 증가할수록 증가됨이 관찰되었다. 이러한 apoptosis의 유

도에 Caspase의 관련성을 조사하기 위하여 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 Caspase-3의 발현 정도를 조사하였다. Caspase-3의 경우 활성화된 형태로 관찰되려면 불활성 형태인 32KDa의 상대적 발현이 줄어들거나 17KDa 및 19KDa의 분자량을 가지는 단백질이 검출되어야한다. 구강 편평세포암종 KB 세포에서 오배자 추출액에 의한 Caspase-3 32KDa 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, 대조군에서는 Caspase-3 32KDa의 발현이 관찰되었으나, 오배자 추출액의 처리에 의해 Caspase-3 32KDa의 발현이 관찰되지 않았다. 구강 편평세포암종 KB 세포에서 오배자에 의한 apoptosis 유발에 Caspase-3 활성화와 연관된 경로가 관련 있을 것으로 생각된다.

결 론

오배자의 구강질환 예방 및 치료에 이용한 효과를 살펴보기 위하여 구강에서 분리된 병원균과 구강편평세포암종에 미치는 영향을 조사한 결과, 오배자 분말의 경우 *C. albicans*와 *S. mutans*, *S. aureus*에서 항균효과가 관찰되었으며, 오배자 물추출액과 에탄올 추출액에서 *S. aureus*와 *C. albicans* 균주에서 항균효과가 관찰되었으며, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. mutans* 그리고 *C. albicans*에 대한 항균 활성을 관찰하기 위해 균 증식 정도를 흡광도로 살펴본 결과 오배자의 농도가 1 mg/ml 이상일 경우 균 증식이 관찰되지 않았다. 또한 이들 균주의 증식에서 pH 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 오배자의 농도가 증가할수록 배지의 pH는 낮아지는 것이 관찰되었다. 오배자의 구강 편평세포암종 KB 세포의 사멸에 미치는 영향을 살펴본 결과 추출액의 농도가 증가할수록 사멸되는 세포의 수가 증가되는 것이 관찰되었다. 오배자 추출액이 구강 편평세포암종 KB 세포에서 세포사멸에 관여하는지를 조사하기 위하여 세포사멸의 진행을 나타내는 sub-G0/G1기의 변화를 살펴본 결과, 오배자 추출액의 농도 증가함에 따라 sub-G0/G1기가 증가됨이 관찰되었으며, 구강 편평세포암종 KB 세포에서 오배자에 의한 apoptosis 유발에 Caspase-3 활성화와 연관된 경로가 관련 있을 것으로 관찰되었다. 이상의 實驗結果를 종합하여 보면, 오배자는 구강에서 분리된 병원성 미생물에 대한 항균효과가 있으며, 구강 편평세포암종 KB세포에 Caspase-3 활성화와 연관된 경로로 apoptosis를 유발하여 항암효과를 기대할 수 있을 것으로 관찰되었다.

참고문헌

1. 김지화, 김명수, 광동주. 구강균의 분리동정 및 생육특성. 한국위생과학회지. 4, 69-76, 1998.
2. 김지화, 송경희, 윤수홍. 구강균의 생육에 대한 각종 향신료의 영향. 한국위생과학회지. 4, 81-86, 1998.
3. 김지희, 이두석, 임치원, 박희연, 박정흠. 충치균 (*Streptococcus mutans*)에 대한 다시마 추출물의 항균활성. 한국수산학회지. 35, 191-195, 2002.
4. 유영선, 박기문, 김영배. 생약재 및 향신료의 *Streptococcus*

- mutans* 증식 억제 효과. 산업미생물학회지. 21, 187-191, 1993.
5. 박정순, 류일환, 이갑상. Aloe vera peel 추출물에 의한 구강 염증 저해 효과의 효소학적 평가. 식품과학과산업. 33, 753-759, 2001.
 6. 유현희, 서세정, 김연화, 이홍수, 김강주, 전병훈, 유용욱. 세균 추출물의 *Streptococcus mutans*에 대한 성장, 산생성, 부착 및 비수용성 글루칸 합성억제에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 17, 666-671, 2003.
 7. 김강주, 전병훈, 우원홍. 황련의 *Streptococcus mutans* 10449의 성장 및 pH 변화에 미치는 영향. 원광생체재료매식 연구소지. 233-237, 1992.
 8. 박정순, 김진숙, 김성효, 신용서, 이갑상, 김강주. 황백물추출물이 *Streptococcus mutans* JC-2의 생육과 산생성에 미치는 억제효과. 대한구강보건학회지. 19, 439-446, 1995.
 9. 장기완, 오인숙, 이정환. Mutans streptococci의 성장에 미치는 Erythritol과 Chitosan, 으름덩굴 및 패 추출물의 병용효과. 대한구강보건학회지. 21, 545-552, 1997.
 10. Silverman SJ and Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data-1973 to 1985. J Am Dent Assoc. 120, 495-499, 1990.
 11. 김정희, 현진원, 김여갑. 천연 약용식물 추출물의 구강상피세포암 세포주에 대한 항암효과. 응용약물학회지. 7, 153-157, 1999.
 12. Lee SC and Kim YG. Oral Maxillfacial Oncology. Jisung, Seoul.
 13. 전국한의학대학 병리학교실. 한방병리학, 한의문화사. 480-482, 2001.
 14. 채병윤. 한방안ibi인후과학. 집문당. 286, 1986.
 15. 전국한의학대학 본초학교실. 본초학. 영림사. 622-623, 1991.
 16. 차배천, 이승배. 오배자의 항산화 및 자유라디칼 소거효과. 한국약용작물학회지. 6, 181-187, 1998.
 17. 김태철, 이기동, 윤형식. 오배자(*Rhus japonica* Linne) Methanol 추출물의 항산화 효과. 한국식품위생안전성학회지. 7, 107-112, 1992.
 18. 송규용, 박병준, 김성훈. 오배자 항혈전 효과. 생약학회지. 33, 120-123, 2002.
 19. 이만중, 김관필, 김성호, 정낙현, 임무현. 오배자와 포도 껍질 추출물의 항균 활성에 대한 연구. 한국식품영양학회지. 10, 174-179, 1997.
 20. 장기완, 강동오, 김환규. 수종 우식원인균에 대한 으름덩굴 (*Akebia quinata*) 추출물의 항세균 및 saliva-coated hydroxyapatite beads에 의한 부착억제 효과. 대한구강보건학회지. 21, 675-684, 1997.
 21. 허준. 동의보감. 여강출판사. 2820, 1994.
 22. 김정희, 현진원, 김여갑. 천연 약용식물 추출물의 구강상피세포암 세포주에 대한 항암효과. 응용약물학회지. 7, 153-157, 1999.
 23. 박정희, 한두석. 소엽의 메탄올분획이 인체 구강유상피암세포에 미치는 항암효과. 원광치의학. 6, 161-173, 1996.
 24. ElAttar TM, Virji AS. Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. Anticancer Drugs. 10, 187-193, 1999.
 25. Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. Cancer. 86, 913-920, 1999.
 26. Mishima K, Nariai Y, Yoshimura Y. Carboplatin induces Fas (APO-1/CD95)dependent apoptosis of human tongue carcinoma cells: sensitization for apoptosis by upregulation of FADD expression. Int J Cancer. 105, 593-600, 2003.
 27. 김정희, 현진원, 김여갑. 천연 약용식물 추출물의 구강상피세포암 세포주에 대한 항암효과. 응용약물학회지. 7, 153-157, 1999.