

(-)-Epigallocatechin의 *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* 및 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 항균 효과

박재윤 · 김화숙¹ · 국중기^{2†}

조선대학교 의과대학전문대학원 생화학 분자생물학교실,
¹전남과학대학 치위생과, ²조선대학교 치의학전문대학원 구강생화학교실

Antimicrobial effect of (-)-epigallocatechin on *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis*

Jae-Yoon Park, Hwa-Sook Kim¹ and Joong-Ki Kook^{2†}

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

¹Department of Dental Hygiene, Chunnam Techno College, Chunnam 516-911, Korea

²Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract The aim of this study was to investigate the antimicrobial effect of (-)-epigallocatechin on *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis*. To test the antimicrobial effect of (-)-epigallocatechin, the minimum inhibitory concentration (MIC) of against 4 strains of *F. nucleatum*, 2 strains of *P. intermedia*, and 2 strains of *P. gingivalis* was measured by broth dilution method. Time-kill curves were assessed for susceptible bacteria, testing 0×MIC (control group), 0.5×MIC, 1×MIC, and 2×MIC for (-)-epigallocatechin, by counting viable bacteria after 3, 90, 180, 360, 720, 1440 minutes. The MIC of (-)-epigallocatechin was 0.312-0.625, 0.625, and 0.625 mg/ml on the strains of *F. nucleatum*, *P. intermedia*, and *P. gingivalis*, respectively. Time-kill curves demonstrated (-)-epigallocatechin had bactericidal activity on *P. intermedia* ATCC 25611^T, *P. gingivalis* ATCC 53978, and *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T. The results suggest that (-)-epigallocatechin can be useful in developing the oral hygiene product such as tooth past and gargling solution for the prevention of periodontal diseases.

Key words Antimicrobial effect, (-)-Epigallocatechin, Periodontal diseases

서 론

치주질환은 우리나라 성인 중 대부분이 가지고 있는 일종의 만성질환으로 구취, 치아상실 등의 구강 내 증상 뿐만 아니라 심혈관질환, 호흡기 세균 감염성 질환, 조산 및 저체중아 출산 등을 유발시킬 수 있는 것으로 보고되었다^{1,2)}. 이러한 치주질환은 내분비 계통의 이상과 같은 전신 질환이 원인이 되기도 하지만, 치은연하 치면세균막에 존재하는 그람 음성 세균이 주요 원인인 것으로 알려져 있다³⁾. 사람의 치면세균막에는 현재 약 400 여종(species)의 세균이 서식하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 이들 중에서 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggre-*

gatibacter actinomycetemcomitans, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* 및 *Fusobacterium nucleatum* 등이 치주질환과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다³⁾.

치주질환의 주요 원인이 치은연하 치면세균막에 존재하는 그람 음성 혐기성 세균이기 때문에 치주질환의 예방 및 치료에 있어서 치면세균막의 형성을 억제하거나 제거하는 것이 가장 중요하다고 할 수 있다. 환자 스스로 치은연하 치면세균막을 제거할 수 있는 방법으로는 잇솔질이 가장 좋은 방법이라 할 수 있다. 하지만, 치아와 치아 사이나, 잇솔질이 어려운 부분의 치면세균막은 제거가 어렵다. 이러한 단점은 치간 잇솔, 치실 및 가글린 등의 구강위생용품을 이용함으로써 극복할 수 있다. 특히 가글린의 경우 주요 성분 중 하나가 항균물질이다. 여러 항균물질 중 항생제는 빈번하게 사용할 경우 내성을 유발시키는 문제가 있다. 이러한 항생제의 단점을 극복하기 위하여 한방에서 사용되고 있는 천연추출물을 이용하려는 연구

[†]Corresponding author
Tel: 062-230-6877
Fax: 062-224-3706
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

들이 활발하게 진행되고 있다.^{5,6)}

녹차는 예로부터 우리나라의 가장 대표적인 차로 알려져 있으며, 항산화 효과뿐만 아니라 항세균 작용도 있는 것으로 알려져 있다. 특히 녹차에는 폴리페놀류인 여러 종류의 카테킨이 존재하고, 이들이 항세균 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 그러므로 본 연구에서는 녹차의 폴리페놀류 중 수용성인 (-)-epigallocatechin이 3종의 치주 질환 원인균에 미치는 항세균 항생균 작용을 조사하여 향후 구강위생용품 개발에 사용가능한 지에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에 사용된 (-)-epigallocatechin은 Sigma 사(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 연구방법

1) 세균 및 세균 배양

본 연구에 사용된 *Fusobacterium nucleatum* 4균주(ATCC 25586, ATCC 10953, ATCC 49256, ATCC 51190), *Prevotella intermedia* 2균주(ATCC 25611, ATCC 49046) 그리고 *Porphyromonas gingivalis* 2균주(ATCC 33277, ATCC 53978)는 ATCC(American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 이들 균주들을 배양하기 위해 *F. nucleatum*은 tryptic soy broth에 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% glucose, 0.02% L-tryptophan, 4 µg/ml erythromycin, 5 µg/ml crystal violet, 5.0% Sheep blood 및 1.5% agar가 포함된 선택배지에서 배양하였다. 그리고 나머지 균주들은 혈액천천배지(tryptic soy broth 3%, yeast extract 0.5%, 0.025% resazurin 2 ml, agar 1.5%, cysteine HCl-H₂O 0.05%, hemin solution 0.5 mg/ml, vitamin K₁ 2 µg/ml, sheep blood 5.0%)를 사용하여 배양하였다. 모든 균주는 37°C, anaerobic gas mixture(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) 조건에서 배양하였다.

2) 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)

본 연구에서 사용된 그람 음성 혐기성 세균에 대한 (-)-epigallocatechin의 항균효과를 측정하기 위한 최소성장억제농도는 액체 배지 희석법으로 측정하였다¹⁰⁾. 이때 각각의 추출물의 농도가 1.25, 0.625, 0.312, 0.16, 0 µg/ml가 되도록 조절된 0.1 ml의 액체배지에, Microplate Autoreader(Model; EL311SX, BIO-TEX Instruments Inc., Cortland, NY, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에 대한 흡광도가 0.1로 일정하게 현탁된 세균배양액을 각각 0.1 ml 씩 접종하였다. 각각의 선택 배지에 키운 균주들을

자신들의 액체배지에서 24시간 동안 배양한 후 Microplate Autoreader를 이용하여 540 nm의 파장에 대한 이들 배양액의 흡광도를 측정하였다. 이 때 각 균주들을 1×10⁶ CFU/ml이 되도록 각각의 배지로 희석하였다. 100 µl의 (-)-epigallocatechin(5 mg/ml) 용액을 96 well plate에 넣은 후 각각의 배지로 1/2씩 순차적으로 희석하고, 희석된 균주를 100 µl 씩 넣은 후 37°C, 혐기성 조건에서 24시간 동안 반응하였다. 이들 각 반응물을 각 균주들의 선택배지에 5 µl 씩 접종하고 다시 37°C에서 24시간 동안 배양하여 균주의 집락형성 여부를 확인하여 최소성장억제농도를 측정하였다.

3) Time-kill assay

(-)-Epigallocatechin의 각각의 세균에 대한 MIC 농도(1×MIC) 및 이의 0.5배(0.5×MIC) 및 2배(2×MIC) 농도에서 3, 90, 180, 360, 720, 및 1440분이 경과함에 따른 항균력을 측정하여, (-)-epigallocatechin이 각각의 세균에 살균제 혹은 정균제의 특성을 갖는 지를 조사하였다. 균주를 각각의 액체배지에 24시간 배양한 후 파장 540 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 균주가 1×10⁶ CFU/ml이 되도록 희석하였다. 앞에서 제시한 3가지 조건(0.5 × MIC, 1×MIC 및 2×MIC)에 맞게 (-)-epigallocatechin과 세균 배양액을 혼합(1 ml)하여 혐기성 배양기에서 배양시키고, 조사하고자 하는 배양 시간마다 20 µl를 취하였다. 이를 고체배지에 100배 또는 10,000배 희석하고 도말하여 48시간 동안 배양한 후 형성된 균락을 계수화 하였다. 이 때 (-)-epigallocatechin을 첨가하지 않고 세균 배양액을 혼합한 균을 대조군으로 사용하였다. 각각의 실험은 모두 2회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

본 연구 결과에 의하면, (-)-epigallocatechin은 주요한 치주질환 원인균인 *F. nucleatum*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에 대한 항균 작용이 있었고, 최소성장억제농도는 0.625 mg/ml 이하였다(Table 1). 최근 Hirasawa 등⁹⁾이 녹차의 카테킨 성분들의 치주질환 원인균들에 대한 항균능을 조사한 실험 결과에 의하면, *P. gingivalis*와 *Prevotella* 종들에 대한 최소억제농도가 1 mg/ml이었다. 또한, Lee 등¹¹⁾의 보고에 의하면, 녹차로부터 추출된 수용성 분획인 CHMC-2032에 대한 *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* 및 *P. endodontalis* 균주에 대해 최소성장억제 농도가 대부분 2.5 또는 5.0 mg/ml에서 최소성장억제농도 값을 보였다. CHMC-2032 성분의 약 60%가 폴리페놀류인 카테킨임 점을 고려한다면, 본 연구에서 측정된 (-)-epigallocatechin의 *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에 대한 최소성장억제농도는 CHMC-2032에 들어 있는 카테킨들에 의한 *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에

Table 1. Minimum inhibitory concentration of (-)-epigallocatechin against three species of periodontopathogens

Strains	MIC (mg/ml)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T	0.625
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 ^T	0.312
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T	0.312
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 ^T	0.625
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 ^T	0.625
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 49046	0.625
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^T	0.625
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 53978	0.312

대한 최소성장억제농도보다 최소 2배 이상 낮았다. 이는 CHMC-2032에 들어있는 여러 카테킨 성분들 중에서 (-)-epigallocatechin의 항균능이 비교적 높다는 것을 간접적으로 시사하는 결과이다.

(-)-Epigallocatechin의 *F. nucleatum*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에 대한 항균능이 살균작용에 의한 것인지, 정균작용에 의한 것인지를 알아보기 위하여 Time-kill 분석법을 실시하였다. 그 결과, (-)-epigallocatechin은 본 연구에 사용한 3가지 세균 중에 살균제로 작용함을 알 수 있었다 (Fig. 1). *F. nucleatum*은 구강 내 대부분의 세균과 응집할 수 있는 능력을 가지고 있고, 치면세균막의 생성과정에서 초기에 집락하는 통기성의 그람 양성세균들과 후기에 집락하는 혐기성의 그람 음성 세균들의 연결고리 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 또한, 치면세균막 내의 산소를 제거하여 혐기성 조건을 유지시켜 혐기성 세균인 *P. gingivalis*의 성장을 돕는 역할을 하거나¹³⁾, 숙주의 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 이차면역 반응을 차단하는 역할을 하여, *A. actinomycetemcomitans*가 숙주의 방어 체계로 부터 자유롭게 하여, 치주질환의 진행에 영향을 미칠 수 있도록 도와주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 그러므로 (-)-epigallocatechin이 *F. nucleatum*에 대하여 살균작용을 갖는다는 것은 혐기성 조건의 후기 치면세균막의 형성을 차단할 수 있고, 병원성이 강한 것으로 알려진 *A. actinomycetemcomitans* 등의 치주 세균에 대한 면역작용을 유지할 수 있게 하여, 치주질환의 예방 및 치주질환의 외과적 처치 후 재발방지를 위한 약제로 사용할 수 있다는 의미를 갖는다고 할 수 있다.

*P. intermedia*는 그람 음성 혐기성 간균으로 구강 상피 세포에 침입(invasion)할 수 있으며¹⁵⁾, 내독소¹⁶⁾ 및 암모니아 등 독성의 대사산물¹⁷⁾을 분비하는 능력을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 실제로 *P. intermedia*는 급성괴사성 궤양성치은염(acute necrotizing ulcerative gingivitis)을 비

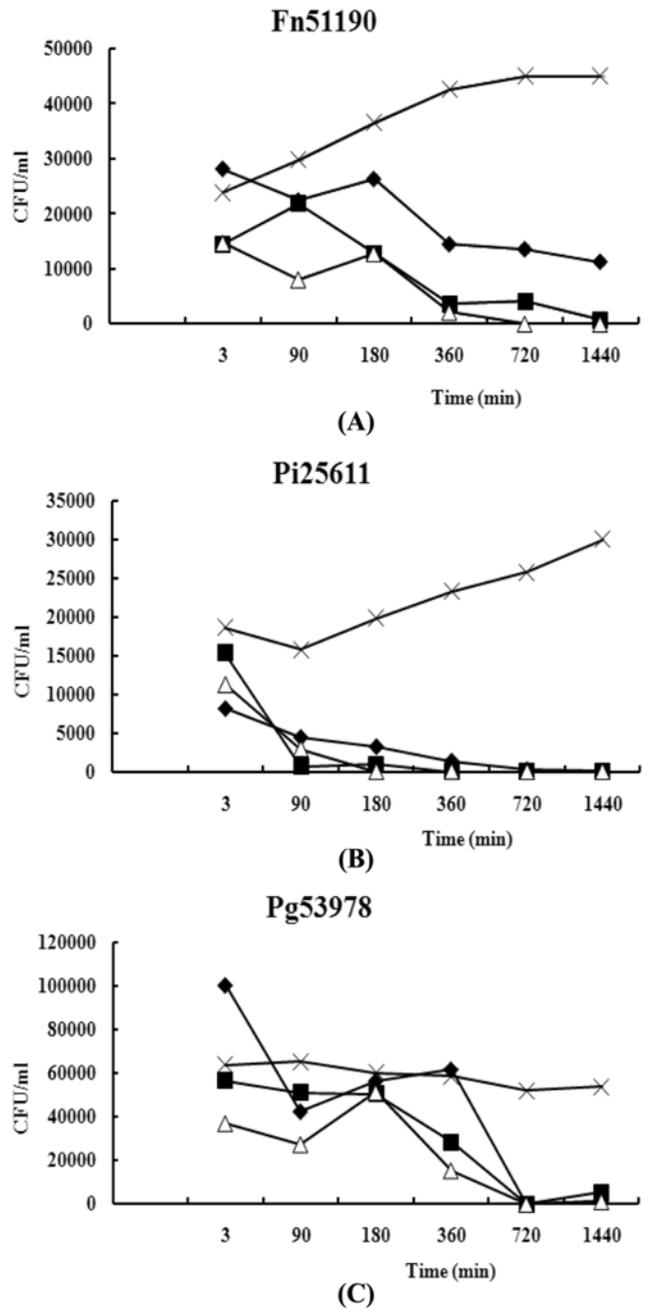


Fig. 1. (-)-Epigallocatechin time-kill curve on (A) *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T, (B) *P. intermedia* ATCC 25611^T, and (C) *P. gingivalis* ATCC 53978^T at different concentrations. x, Control; ◆, 0.5xMIC; ■, 1xMIC; △, 2xMIC.

롯한 성인성 치주염에 이환된 환자의 치은연하 치면세균막 부위에서 빈번하게 검출됨이 보고되었다^{18,19)}. 또한, 최근 한국인의 치은염 환자를 대상으로 비외과적 치주치료 전 치은연하 치면세균막에 *P. intermedia*가 존재할 경우 통계학적으로 가장 유의성 있게 비외과적 치주치료 예후가 좋지 못함을 발견하여, *P. intermedia*가 일종의 치주치료 예후의 세균학적 marker로 사용할 수 있을 것으로 보고되었다²⁰⁾. *P. gingivalis*도 그람 음성 혐기성 세균으로 3대 치주질환 원인균으로 잘 알려져 있다²¹⁾. *P. gingivalis*

의 주요 독립인자는 단백질분해효소들로, 이들은 치주질환의 진행시 결합조직의 파괴에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 치주질환 뿐만아니라 심혈관계질환과도 관련성이 높은 것으로 알려져 있다²²⁾. 본 연구 결과 (-)-epigallocatechin 이 *P. intermedia*와 *P. gingivalis*에 대하여 살균작용을 가지고 있기 때문에 치주질환의 예방 및 치주 치료 후 예후를 좋게 할 수 있는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, (-)-epigallocatechin은 중요한 치주질환 원인균이라 할 수 있는 *F. nucleatum*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis* 에 대한 살균 효과가 있음을 알 수 있었고, 이를 이용한 치주질환 예방 및 예후를 증진시킬 수 있는 가글린 및 치약 등의 구강위생용품 개발에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

녹차의 폴리페놀류 중 수용성인 (-)-epigallocatechin을 이용하여 치주질환 원인균에 대한 항세균 작용을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. (-)-epigallocatechin은 주요한 치주질환 원인균들인 *F. nucleatum*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에 대한 최소성장억제농도가 0.625 mg/ml 이하로 항균 작용이 높은 것으로 나타났다.
2. Time-kill 분석법을 실시한 결과 (-)-epigallocatechin 은 *F. nucleatum*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에 살균작용이 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 (-)-epigallocatechin은 치주질환의 예방 및 치주 치료 후 예후를 증진시킬 수 있는 가글린 및 치약 등의 구강위생용품 개발에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

참고문헌

1. Gupta S: Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis-focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis* 143(1): 1-6, 1999.
2. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ: Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 71(10): 1554-1560, 2000.
3. Darveau RP, Tanner A, Page RC: The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 14: 12-32, 1997.
4. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE: Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12): 3770-3783, 2001.
5. Lacroix JM, Walker CB: Detection and prevalence of the

tetracycline resistance determinant *Tet Q* in the microbiota associated with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 11(4): 282-288, 1996.

6. Olsvik B, Tenover FC: Tetracycline resistance in periodontal pathogens. *Clin Infect Dis* 16(4): S310-S313, 1993.
7. Hattori Met, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y: Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38(3): 717-720, 1990.
8. Lim SH, Seo JS, Yoon YJ, Kim KW, Yoo SY, Kim HS, Kook JK, Lee BR, Cha JH, Park JY: Effect of leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* on viability of mutans streptococci isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. *Korean J Orthodon* 33(5): 381-389, 2003.
9. Hirasawa M, Takada K, Makimura M, Otake S: Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: A clinical pilot study. *J Periodontal Res* 37(6): 433-438, 2002.
10. Murray PR, Jorgensen JH: Quantitative susceptibility test methods in major united states medical center. *Antimicrob Agents Chemother* 20(1): 66-70, 1981.
11. Lee ES, Ahn TY, Yoon JJ, Kook JK, Lee RL, Kim DK: Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. *J Korean Acad Dent Health* 27(4): 569-579, 2003.
12. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV: Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J* 7(5): 406-413, 1993.
13. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH: *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiol* 148(Pt2): 467-472, 2002.
14. Tew JG, Thomas SS, Ranney RR: *Fusobacterium nucleatum*-mediated immunomodulation of the *in vitro* secondary antibody response to tetanus toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 22(6): 506-512, 1987.
15. Dorn BR, Leung KL, Progulske-Fox A: Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun* 66(12): 6054-6057, 1998.
16. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS: *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res* 39(6): 424-431, 2004.
17. Saito K, Takahashi N, Horiuchi H, Yamada T: Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 36(6): 355-360, 2001.
18. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP: Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett* 178(2): 299-304, 1999.
19. Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlén G: "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J Periodontol* 71(6): 885-897, 2000.
20. Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK: Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in

- Koreans. *Microbiol Immunol* 49(1): 9-16, 2005.
21. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2): 134-144, 1998.
22. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I: Systemic diseases

caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 13(4):547-558, 2000.

(Received April 6, 2010; Revised June 17, 2010;
Accepted June 18, 2010)

